



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

ANA FILIPA DOURADO SOTERO

***TÉCNICAS DE PRESERVAÇÃO DE ENXERTOS
PARA TRANSPLANTE RENAL***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE UROLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
MESTRE PEDRO TIAGO COELHO NUNES
MESTRE PEDRO NETO SANTOS DE BARROS MOREIRA**

MARÇO/2015

Índice

1. Abstract	6
2. Resumo	7
3. Introdução	8
4. Material e Métodos	10
5. Resultados	11
<i>5.1 Tempo de isquemia</i>	<i>11</i>
<i>5.2 Tipos de dador</i>	<i>14</i>
<i>5.3 Resultados em transplantação</i>	<i>16</i>
<i>5.4 Perspectiva histórica da preservação de enxertos</i>	<i>18</i>
<i>5.5 Técnicas de preservação</i>	<i>18</i>
5.5.1 Preservação estática em frio	19
5.5.2 Métodos de Preservação dinâmicos	23
5.5.2.1 Perfusão Hipotérmica	23
5.5.2.2 Perfusão Normotérmica	34
5.5.2.2.1 Perfusão Normotérmica Regional	34
5.5.2.2.2 Máquina de Perfusão Normotérmica	36
5.5.2.2.3 Recondicionamento Normotérmico	40
5.5.2.3 Persuflação Venosa de Oxigénio	40
<i>5.6 Oxigenação em preservação de enxertos</i>	<i>41</i>
<i>5.7 Avaliação da Viabilidade do enxerto</i>	<i>43</i>
5.7.1 Avaliação da viabilidade antes da colheita do enxerto	43
5.7.2 Avaliação da viabilidade durante a preservação do enxerto	44

5.8 <i>Manipulação do enxerto</i>	48
5.8.1 Terapêutica celular e Terapêutica Génica	51
6. Discussão e Conclusão	54
7. Agradecimentos	57
8. Referências Bibliográficas	58

Lista de Siglas

Ala-AP – Alanina aminopeptidase

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

cGMP – Guanosina monofosfato cíclica

CMV – Citomegalovírus

coPP – Cobalto Protoporfirina

DCA – Dadores com critérios alargados

DMC – Dadores em morte cerebral

DMCirc – Dadores em morte circulatória

ECMO – Suporte extracorpóreo de oxigenação por membrana

FGF – Fator de crescimento dos fibroblastos

GST – Glutathione- S- transferase

HEPES – Ácido etanosulfônico 4-2-hidroxietil piperazina -1

H-FAB – Proteína ligante de ácidos gordos do tipo cardíaca

HLA – Antígeno leucocitário humano

HMP – Hypothermic machine preservation

HTK – Solução Histidina- Triptofano – Cetoglutarato

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1

IECA – Inibidor da enzima de conversão da angiotensina

IL-6 – Interleucina 6

IL-18 – Interleucina 18

IPOS – Sistema de preservação de órgão isolado

LDH – Lactato desidrogenase

LPOP – Produtos de peroxidação lipídica

MAPcinases – Proteínas cinases mitogénicas ativadas

MeSH – Medical Subject Headings

MPH – Máquina de perfusão hipotérmica

MPN – Máquina de perfusão normotérmica

MSC – Células tronco mesenquimatosas

NAG – N- acetil- β - D- glucosaminidase

NGAL – Lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos

NGF- β – Fator de crescimento neuronal do tipo β

NMP – Normothermic machine preservation

OPTN - Organ Procurement and Transplantation Network

PEF – Preservação estática em frio

PFCs – Perfluorocarbonetos

PNR – Perfusão normotérmica regional

RME – Espetroscopia por ressonância magnética ou ressonância magnéticas espectral

RN – Recondicionamento normotérmica

siRNA- RNA de interferência

SPT – Sociedade Portuguesa de Transplantação

TFG – Taxa de filtração glomerular

TNF – Fator de necrose tumoral

UW – Solução da Universidade Wisconsin

UNOS – United Network for Organ Sharing

QALY – Anos de vida ajustados à qualidade

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Eventos isquémicos afetados pela hipotermia (adaptado de <i>Taylor M.</i> (12))	12
Tabela 2 - Classificação de Maastrich de dadores em morte cardiocirculatória	15
Tabela 3 - Principais soluções de preservação e sua composição. (1,10,30)	22
Tabela 4 - Principais estudos comparativos entre os resultados obtidos com máquina de perfusão hipotérmica vs preservação estática em frio	32
Tabela 5 - Principais estudos comparativos entre os resultados obtidos com máquina de perfusão hipotérmica vs preservação estática em frio	33
Tabela 6 - Benefícios da perfusão regional em hipotermia e normotermia	35

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da máquina de perfusão hipotérmica.	24
Figura 2 - Principais benefícios atribuídos à máquina de perfusão.	26
Figura 3 - Principais dispositivos / máquinas de perfusão para preservação de rins.	27
Figura 4 - Diagrama esquemático do sistema de preservação de órgão isolado.	36
Figura 5 - Terapêuticas de manipulação do enxerto em função dos diferentes níveis de atuação: no dador, durante a preservação e no recetor.	48

1. Abstract

The number of patients awaiting transplantation has outnumbered the number of available kidneys. A discrepancy between demand and supply has motivated the exploration of other kidney sources, such as expanded criteria donors and donation after cardiac death. Kidneys from these donors are highly sensitive to ischemia-reperfusion injuries – the typical lesions occurring after transplantation. Despite years of research, static cold storage remains the gold standard in kidney transplantation. This kind of preservation is unable to fully protect kidneys from marginal donors, highlighting the need for novel strategies. Optimizing the preservation of such kidneys has become a significant issue in the field. The aim of this study is to review the current status of graft preservation methods; enunciate the principles of organ preservation and perfusion as they relate to indication.

Techniques of perfusion play an important role in graft function after transplantation. Some studies suggest that HMP (hypothermic machine preservation) and NMP (normothermic machine preservation) may improve outcomes after transplant. It also provides the opportunity to assess viability and to manipulate donor kidneys, a tool for preoperative selection and recovery.

Keywords: kidney transplant, organ preservation, graft preservation, cold- storage, machine perfusion, viability testing, graft viability

2. Resumo

O número de doentes em lista de espera para transplante renal supera grandemente o número de enxertos disponíveis para o efeito. A discrepância entre a demanda e a oferta tem motivado o uso de rins de outro tipo de fontes, como dadores com critérios alargados e dadores após morte cardiocirculatória. Porém, os rins deste tipo de dadores são extremamente sensíveis às lesões de isquémia-reperfusão – as mais típicas encontradas durante a preservação. Apesar dos longos anos de investigação, a preservação estática em frio continua a ser o padrão em transplantação renal. No entanto, este tipo de técnica é incapaz de proteger completamente os enxertos deste tipo de dadores, realçando a necessidade de novas técnicas. Assim, otimizar a preservação deste tipo de órgãos tornou-se uma importante questão nesta área.

O objetivo deste estudo é rever os métodos de preservação de enxertos para transplante renal, enunciar os princípios subjacentes aos mesmos e as suas indicações relativas e vantagens.

As técnicas de perfusão têm um papel muito importante na função do enxerto pós-transplante. Alguns estudos sugerem que a MPH (máquina de perfusão hipotérmica) e MPN (máquina de perfusão normotérmica) podem melhorar os resultados pós-transplante. Estas técnicas abrem ainda uma janela para a oportunidade de avaliação da viabilidade e manipulação de enxertos, um importante instrumento para a seleção e recuperação pré-operatória dos mesmos.

Palavras chave: Transplantação renal, preservação de órgãos, preservação de enxertos, preservação estática em frio, máquina de perfusão, avaliação de viabilidade, viabilidade do enxerto

3. Introdução

O transplante renal é universalmente considerado o tratamento de escolha para doença renal terminal e insuficiência renal estabelecida nos doentes devidamente selecionados (1). A vasta e disseminada ocorrência de doença renal anexa ao facto de este ser o tratamento mais custo-efetivo reveste todo o processo de particular importância. Um dos grandes desafios colocados a este tipo de terapêutica prende-se com o número escasso de doadores e com a discrepância crescente entre o número de transplantes efetuados e o número de doentes em lista de espera (2).

Nos Estados Unidos entre 2001 e 2006, o número de enxertos transplantados de doadores cadáver aumentou 24% em geral e 26% para os rins. No entanto, no período mais recente, entre 2006 e 2008, o número de enxertos obtidos de doadores cadáver aumentou menos de 1% do total e apenas 3% para enxertos renais. Em contraste, o tamanho da lista de espera, entre 2001 e 2006 aumentou 27% em geral e 48% para transplantes de rim isolado, aumentando 11% e 18%, respetivamente no período referente a 2006 – 2008 (3).

Segundo a Organ Procurement and Transplantation Network nos Estados Unidos desde 2004 que a discrepância entre a lista de espera e o número de transplantes não pára de aumentar e entre 2009-2012 resultou em mais de 21.000 (16,7%) candidatos removidos da lista de espera por morte ou doença. Dos candidatos listados em 2009, 43% ainda continuavam em lista de espera em 2012, 9,3% faleceram, 8,4% foram retirados da lista por doença, e apenas 39,3% tinham sido submetidos a transplante (4).

Em Portugal e segundo dados da SPT, em 2010 cerca de 16764 doentes encontravam--se em terapêutica de substituição da função renal e destes apenas 5976 (35%) correspondiam a transplantados, alertando para o facto de que, embora seja a melhor terapêutica substitutiva da função renal, a lista de espera é também crescente e o número de doadores disponíveis é igualmente fator limitante (5).

Face a este paradigma, o número de dadores disponíveis é tido como parte integrante e determinante do processo de transplantação, tendo as técnicas de preservação um papel fulcral na preservação deste escasso e precioso bem que é o rim .

Desde o momento da colheita do órgão do dador até ao momento do seu transplante no receptor, um conjunto crucial de processos fisiopatológicos ocorrem. Assegurar a qualidade e a viabilidade do órgão e permitir que o processo de transplantação seja feito numa base não-urgente (o que inclui estudos de compatibilidade, transferências de órgão entre centros etc.) é o principal objectivo das técnicas de preservação.

No dias de hoje e na prática clínica corrente, muitos dos órgãos são preservados segundo o método clássico de preservação estática no frio e várias são também as soluções de preservação disponíveis no mercado para o efeito (6). Contudo, nem todos os rins conseguem bons resultados com esta técnica e um conjunto de órgãos são submetidos a outros métodos, conhecidos como técnicas de perfusão. Não existe um método de preservação perfeito e a escolha da técnica permanece um tema em discussão.

A maioria dos enxertos continua a ser obtida de dador em morte cerebral. Porém, com a crescente necessidade de órgãos e como forma de aumentar o “*pool*” de potenciais dadores, muitos centros passaram a usar órgãos de “dadores marginais” e de “dadores após morte circulatória” (7). Até há algumas décadas atrás este tipo de órgãos seriam rejeitados por serem considerados subótimos ou marginais. A sua utilização coloca, assim, um desafio ainda maior à transplantação e às técnicas de preservação em si.

Os objetivos desta revisão centram-se em entender as principais técnicas de preservação disponíveis, conhecer as diferenças entre as mesmas e reconhecer as suas eventuais indicações relativas.

4. Material e Métodos

O material bibliográfico utilizado para a realização desta revisão foi obtido através de pesquisa na base de dados electrónica Pubmed/MEDLINE (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), entre 20 de Maio de 2014 e 2 de Outubro de 2014.

Na pesquisa bibliográfica foram utilizados os termos “organ preservation” “kidney transplantation” “kidney preservation/techniques/methods” “graft preservation” “machine perfusion” “machine perfusion/hypothermic/normothermic” “dcd” “ecd” “donation after cardiac death” e os seguintes termos *MeSH* “organ preservation” “organ preservation/methods” “organ preservation/solutions” “kidney transplantation” em diferentes combinações. Foi aplicado um filtro temporal aos últimos 10 anos e apenas foram seleccionados artigos em inglês. Desta pesquisa resultaram 281 artigos (42 eram revisões e os restantes artigos científicos e cartas para o editor), dos quais 127 foram seleccionados com base no título, destes, 72 foram seleccionados com base no *abstract*. Por forma a não deixar de incluir nenhum artigo relevante, foi feita uma revisão da bibliografia destes artigos tendo sido adicionados 32 artigos pela relevância que apresentavam. Foi ainda consultado material da Sociedade Portuguesa de Transplantação e o relatório anual da UNOS/OPTN (*United Network for Organ Sharing / Organ Procurement and Transplantation Network*).

5. Resultados

5.1 Tempo de isquemia

A isquemia é definida, segundo o sistema MeSH, como uma hipoperfusão de sangue num órgão ou tecido causada por constrição patológica ou obstrução dos vasos sanguíneos, ou ausência de circulação sanguínea.

Em transplantação, o período de isquemia a que um órgão é sujeito é dividido em isquemia quente e isquemia fria.

A isquemia quente é definida como o período de tempo desde que o órgão é privado de sangue, oxigênio e nutrientes, enquanto o metabolismo celular continua, até ao início da perfusão a frio (2,8). A isquemia fria é definida como o período de tempo desde o início da perfusão do órgão com a solução de preservação até ao restabelecimento da perfusão sanguínea durante o transplante. O último é determinado sobretudo à conta de fatores logísticos (tipagem molecular do recetor, transporte de órgãos entre centros, preparação do bloco operatório e da equipa) (9).

Todos os rins, independentemente do tipo de dador, são sensíveis à isquemia (10), embora a causa dessa isquemia dependa do tipo de dador. A isquemia em rins de dador vivo é considerada mínima e é induzida por um curto período de preservação, sendo por isso associada a sobrevivências do enxerto maiores (11). Em dadores em morte cerebral a isquemia resulta, em regra, de longos períodos de preservação hipotérmica. Por sua vez, em dadores após morte cardíaca, a isquemia ocorre por uma combinação entre isquemia quente e isquemia fria. A primeira desde o momento em que o coração pára até à colheita e a segunda durante o período de preservação propriamente dito.

Do ponto de vista fisiopatológico, há uma complexidade de mecanismos envolvidos nas lesões de isquemia, os quais podem ser agrupados de forma simplista em: isquemia e

hipotermia durante a preservação e, reperfusão e reaquecimento aquando da implantação no recetor.

Esse complexo fisiopatológico (isquémia-reperfusão) envolve não só hipóxia e reoxigenação, mas também alterações do equilíbrio iónico da célula conducentes a edema e acidose. Stress oxidativo, disfunção endotelial e alterações da coagulação estão também presentes e associam-se a um estado pró-inflamatório (tabela 1) (11,12). Em todos os casos a isquémia é seguida de reperfusão quando o enxerto é conectado com os vasos do receptor, sendo esta conhecida por exacerbar as lesões iniciadas pela isquémia (10).

Eventos isquémicos afetados pela hipotermia	Principais efeitos
Supressão das taxas de reação	1- Reduz metabolismo e demanda de oxigénio 2- Reduz a taxa de depleção de energia e de substratos 3- Atenua processos químicos que causam lesões isquémicas
Desacoplamento metabólico	Desorganização de vias metabólicas integradas
Metabolismo energético	Mudanças complexas de aeróbio para anaeróbio, determinando temperaturas ótimas de preservação
Transporte iónico e edema celular	Redistribuição passiva de iões e água
Mudanças na atividade dos protões	Alterações na regulação do pH
Geração de radicais livres de oxigénio	Aumenta a suscetibilidade da célula para gerar radicais livres e atenua mecanismos de defesa naturais
Mudanças estruturais	1- Alterações de fase da membrana 2- Choque térmico 3- Indução de proteínas de stress 4- Mudanças no citoesqueleto
Tipo de morte celular	Apoptose ou Necrose

Tabela 1 - Eventos isquémicos afetados pela hipotermia (adaptado de *Taylor M.* (12))

Por outro lado, a isquémia fria aumenta a expressão de genes associados à apoptose, o que se associa a uma diminuição da sobrevivência do enxerto. Assim, quanto maior a demora, isto é quanto maior o tempo de preservação, menos tecido será viável, sendo que esse efeito parece tornar-se particularmente visível pelas 36h (13).

Num estudo multicêntrico Opelz and Dohler (14) concluem que não há influência apreciável na sobrevivência do enxerto com tempos de isquemia até 18 horas de preservação estática em frio. Porém esse efeito começa a notar-se às 19h, onde se regista diminuição da sobrevivência de enxertos. Não se regista um aumento paralelo do número de rejeições, sugerindo que o tempo de perfusão/isquemia não aumenta a imunogenicidade do enxerto. Segundo este mesmo estudo, o número rejeições só aumenta de forma significativa quando os rins são preservados por um período superior a 36h (RR:1.2; IC:1.04-1.39; P=0.011).

Num outro estudo, Plata- Munoz et al (2) concluem que a redução dos tempos de isquemia pode ser particularmente benéfica em rins de dadores após morte cardíaca, beneficiando estes de uma isquemia fria inferior a 14h e sendo desejável e mais custo efetivo quando esta é inferior a 12h.

No estudo pareado de Giblin et al, (15) o grupo comparou a sobrevivência a longo prazo entre recetores do primeiro e do segundo rim do mesmo dador, sendo o tempo de isquemia a única variável significativamente diferente entre os dois grupos (19.93h no primeiro grupo e 25,65h no segundo). Demonstraram que os pacientes que receberam o segundo rim, sujeito assim a maior tempo de isquemia fria obtiveram taxas de sobrevivência a longo prazo significativamente menores, registando também aumentos na função tardia do enxerto e nas rejeições agudas.

As baixas temperaturas têm uma multiplicidade de efeitos (de suporte e destrutivos) nas células, que requerem uma investigação cuidada para permitir a sua utilização de forma ótima em preservação de órgãos (16). Deste modo, a hipotermia e a isquemia parecem ser um factor limitante na preservação de enxertos, particularmente em rins que já foram sujeitos a um período de isquemia quente (9,10).

5.2 Tipos de dador

Até há alguns anos, o dador clássico era o dador jovem, saudável após morte cerebral ou “*heart-beating donor*”(1) ou também chamado de dador com critérios padrão (8). Muitos destes dadores tinham origem em acidentes de viação, porém a melhoria dos cuidados de saúde e o aumento da segurança na estrada contribuiu para a sua diminuição.

Assim, a crescente discrepância entre a necessidade e o número de órgãos disponíveis para transplante tem resultado num aumento do uso de rins de dadores com critérios alargados (17). A definição inclui rins obtidos de todo o tipo de dadores com mais de 60 anos mesmo sem comorbilidades, mas também de dadores entre os 50 e 59 anos com pelo menos duas das seguintes condições: morte de causa cerebrovascular, insuficiência renal com níveis de creatinina maiores do que 133 $\mu\text{mol/L}$ e/ou história de hipertensão arterial (18). A transplantação de um rim de um dador com critérios alargados fornece uma vantagem substancial na sobrevivência mesmo com a manutenção em diálise nos 18 meses pós-transplante, apesar de resultados inferiores aos obtidos com dadores padrão (8). A idade do dador é um dos mais importantes fatores de risco independentes associados a piores resultados pós transplante (19). Isto parece dever-se à diminuição da capacidade do órgão em resistir a lesões induzidas pelo complexo isquémia-reperfusão, devido a uma reserva funcional diminuída e à vasculopatia associada à idade. Contudo, face à escassez atual, este tipo de órgãos, ainda que subótimos são um recurso cada vez mais importante.

Outro tipo de dadores são os dadores após morte cardiocirculatória, “*non-heart-beating donors*”, estes são categorizados de acordo com a classificação de Maastricht (tabela 2). As categorias são: morte controlada (quando a morte cardíaca é esperada, mas não estão preenchidos os critérios para morte do tronco cerebral) e morte não controlada (quando a morte cardíaca não é esperada). Os rins do último tipo de dadores são, naturalmente, sujeitos a um maior tempo de isquémia quente (20).

Categoria Maastricht	Descrição
I	Morte na chegada (não controlada)
II	Insucesso na ressuscitação (não controlada)
III	Paragem cardíaca esperada (controlada)
IV	Paragem cardíaca durante morte cerebral (controlada)

Tabela 2 - Classificação de Maastricht de dadores em morte cardiocirculatória

Catena, Coccolini, Motori et al (1) estimam que só as categorias II e III da classificação de Maastricht contribuam para 20 a 40% de todo o *pool* de dadores. Embora aparente ser promissor, este número não corresponde ao número de transplantes que é possível efetuar porque a preservação estática em frio, técnica utilizada na maior parte dos centros, não serve como técnica de preservação quando os períodos de isquémia quente excedem os 20 minutos, o que acontece em muitos destes órgãos.

O uso de órgãos deste tipo de dadores é ainda um tema em discussão acesa, Dominic Summers et al (21) mostraram também que rins de dadores mortos com mais de 60 anos têm mais do dobro do risco de falência do enxerto do que rins de dadores mortos com menos de 40 anos. No entanto, rins de dadores após morte circulatória controlada com mais de 60 anos têm uma sobrevivência do enxerto a três anos equivalente à de dadores após morte cerebral no mesmo grupo etário, sugerindo que a relutância quanto ao uso destes órgãos talvez não se justifique (22).

5.3 Resultados em Transplantação

Inúmeras são as variáveis que influenciam os resultados obtidos em transplantação. Desde as características do dador, à técnica utilizada para preservar os órgãos, à duração dessa mesma preservação até às complicações decorrentes da própria cirurgia. Assim, o sucesso ou insucesso de um transplante é muitas vezes dado por um conjunto de resultados que consideramos resultados primários. Esses “*primary endpoints*” são usados na generalidade dos trabalhos e é com base neles que se torna possível efetuar muitos dos estudos comparativos.

A função tardia do enxerto é um deles, ocorre quando o órgão não funciona de forma apropriada após o transplante e é definida, na generalidade dos estudos, como a necessidade de diálise durante a primeira semana pós-transplante; falência em produzir mais de 40 ml de urina nas primeiras 24h pós-transplante ou uma diminuição da creatinina sérica inferior a 25% nas primeiras 24h.

Disfunção primária do enxerto é definida como a ausência de função do enxerto no momento do transplante, ou falha em conseguir um mês de sobrevivência livre de diálise, excluindo situações de rejeição ou trombose (7). Em geral é um evento raro em transplantação renal, segundo a UNOS (4) ocorre em menos de 2% dos transplantes, sendo muito mais frequente em transplantação hepática.

Falência do enxerto é definida como necessidade permanente de diálise pós transplante.

Além dos *primary endpoints* é também importante conhecer a sobrevivência do enxerto a um ano, a qual na maior parte dos estudos é apresentada sob a forma de valor percentual. Esta refere-se à percentagem dos enxertos transplantados que decorrido um ano pós transplante continua a funcionar de forma correta. A sobrevivência do doente a um ano é também expressa na maior parte dos estudos sob a forma de percentagem e diz respeito aos doentes transplantados que continuam vivos ao fim de um ano de *follow-up*. A importância

da sua análise prende-se com a tentativa de compreender até que ponto é que variáveis que afectam a função tardia do enxerto têm repercussões a médio-prazo no que à sobrevivência diz respeito.

A duração da hospitalização bem como a duração da diálise pós transplante, embora não figurem em todos os estudos, são também parâmetro de avaliação indireta de resultados em transplantação, em muito dependente dos resultados primários (função tardia do enxerto e disfunção primária).

Todas estas variáveis têm vindo a ser utilizadas para efetuar comparações a diversos níveis técnicos e mostram-se também com utilidade crescente em estudos de análise custo-efetividade.

5.4 Perspectiva histórica da preservação de enxertos

A primeira tentativa de perfundir um órgão isolado data de 1849 por Loebel (11,23). Em 1895 Langendorf idealizou uma simples técnica de perfusão e em 1930 Carrel e Lindbergh criaram um pequeno aparelho e perfundiram órgãos com recurso a pequenas bombas (11), começaram por fazê-lo em normotermia e em 1937 passaram a usar a hipotermia. Trinta anos mais tarde, Folkert Belzer com o seu trabalho em técnicas de perfusão hipotérmica para preservação de rins, conseguiu preservar rins durante um período de 17 horas e transplantá-los com sucesso (24). Em 1971 uma bomba portátil foi desenvolvida para facilitar a utilização na clínica, a mini-Belzer.

Também por essa altura, em 1969, Collins e o seu grupo desenvolveram a primeira a solução de preservação, tendo sido modificada em 1976 para dar lugar a Euro-Collins. A revolução foi de tal modo que em meados dos anos 80 a maioria dos rins eram preservados com recurso à preservação estática em frio fazendo uso desta mesma solução (23).

5.5 Técnicas de Preservação

Idealmente uma técnica de preservação bem como uma solução de preservação deve ser capaz de prevenir lesões induzidas pelas baixas temperaturas, hipóxia ou qualquer outra lesão (ex: mecânica, vasoespasmos). Além disso, o método deve ser prático e simples e deve poder ser facilmente implementado por pessoal com diversos níveis de formação. Deve ser um método capaz de ser introduzido no atual esquema de colheita e distribuição de órgãos sem necessidade de grandes alterações. O ideal seria a existência de um método universalmente versátil capaz de ser aplicado a vários tipos de órgãos, independentemente do cenário clínico.

5.5.1 Preservação estática em frio

A preservação estática em frio começou a ser usada na prática clínica em finais de 1960 (3) e é hoje o padrão da preservação em transplantação renal (1,23,25,26).

As primeiras referências na literatura datam de 1963 quando Calne et al mostraram que o simples arrefecimento do rim em água gelada preservava a função renal por 12h (27) .

O princípio base da preservação estática em frio é a supressão do metabolismo com recurso à hipotermia (23), sendo este conhecido como a primeira linha de defesa contra lesões de hipóxia (16).

Segundo esta técnica, um cateter é inserido na artéria renal e utilizando a pressão hidrostática é infundida no rim uma solução de preservação estéril imediatamente a seguir à colheita. Todo o sangue é, assim, retirado do rim. Em seguida, o órgão é deixado num recipiente e imerso numa solução de preservação. Esse recipiente é então coberto com gelo por forma a manter a temperatura entre 4°C e 0°C. Estima-se que a estas temperaturas o metabolismo celular seja reduzido para 5-8%, bem como a atividade enzimática da célula (8).

Várias soluções foram desenvolvidas para minimizar os efeitos deletérios da isquémia fria e da reperfusão, sendo direccionadas a alterações bioquímicas e estruturais específicas que ocorrem durante este processo(28). Durante a hipotermia, os déficits de ATP levam a uma rápida inativação da bomba Na^+/K^+ ATPase o que contribui para um aumento das concentrações de Na^+ intracelular, predispondo ao edema celular que pode ser fatal para as células(29). Deste modo adicionar colóides ou impermeabilizantes às soluções de preservação é uma estratégia muitas vezes adotada em transplantação. A composição da solução deve ser maximamente adaptada à severidade dos danos provocados pela isquémia-reperfusão, uma vez que estes se repercutem na subsequente função do enxerto(9).

Uma das primeiras soluções introduzidas no mercado foi desenvolvida por Collins et al e

mais tarde modificada, durante os anos 80, dando lugar à conhecida solução de Euro-Collins (3). A solução continha uma alta concentração de glucose e electrólitos, assemelhando-se ao ambiente intracelular (30). A introdução desta solução revolucionou a prática da transplantação deixando esta de ser um processo emergente para passar a ser um processo semi-eletivo, uma vez que se passou a conseguir preservar rins por um período de 24h (11).

Desde então várias soluções foram sendo criadas e introduzidas no mercado: a Histidina-Triptofano - Cetoglutarato (HTK), a solução da Universidade de Wisconsin (UW), solução de citrato hiperosmolar, solução de Celsior, solução do instituto George-Lopez e solução Polysol (1,3,8,30) (Tabela 3). De uma forma simplista podemos dividi-las em soluções de tipo intracelular e extracelular. As de tipo intracelular, como é o caso da UW, caracterizam-se pelas baixas concentrações de Na^+ e altas concentrações de K^+ , o que faz com que sejam eficazes a prevenir o edema celular, uma vez que reestabelecem o equilíbrio de Donnan. As soluções de tipo extracelular como a HTK, com baixas concentrações de K^+ e altas concentrações de Na^+ , são mais recentes e tão ou mais eficazes do que as intracelulares, uma vez que o potássio pode induzir vasoespasma (1).

Desde a década de 90 que a UW se tornou o padrão das soluções de preservação, permanecendo até aos dias de hoje como a solução mais utilizada tanto nos Estados Unidos como na Europa.

A simplicidade e facilidade de aplicação deste tipo de técnica são o principal motivo pelo qual é a mais utilizada. Além disso, uma das grandes vantagens atribuídas à preservação estática em frio é a sua capacidade de perfundir o órgão com substâncias terapêuticas, como antioxidantes, enquanto se atrasa temporariamente a introdução de oxigénio. Esta estratégia parece ser especialmente útil em órgãos sujeitos a uma isquémia quente considerável. Rins de dadores após morte circulatória parecem ser menos tolerantes a uma preservação estática em

frio (21). Por outro lado, estudos afirmam que a possível indução de um período de anóxia pode ser uma tecnologia explorável. As evidências que apoiam um potencial benefício da exposição contínua à hipóxia por um período de tempo após a colheita podem ser encontradas na literatura que descreve o efeito protetor de gases que afetam as mitocôndrias, em concentrações que estavam acima daquelas que inibem consumo de oxigênio (3).

Uma estratégia desenhada para tirar o maior proveito deste estado de hipóxia transitória, possibilitado pela preservação estática em frio, é usar esta técnica como ponte para a utilização de perfusão. Esta combinação torna-se particularmente útil em situações que envolvam transporte e partilha de órgãos entre centros, evitando o transporte de máquinas de perfusão. Contudo, a aplicação desta estratégia necessita de ser avaliada caso a caso, tendo em vista o tipo de dador e o estado do órgão no momento da colheita no que diz respeito ao grau de lesão isquêmica.

Apesar das aparentes vantagens, sobretudo a nível logístico, numa era em que a disponibilidade de órgãos é escassa e se assiste a um aumento da utilização de órgãos subótimos a preservação estática em frio começa a apresentar algumas limitações (31).

	Euro-Collins	UW	Belzer's MPS *	HTK	Celsior	Polysol	Custodiol-N
Eletrólitos							
Sódio	9.3	25	100	15	100	136	16
Potássio	115	125	25	20	25	5	10
Magnésio	4.7	5	5	4	13	14	8
Cálcio	-		0.5	0.015	0.25	9	0.02
Cloro	15		1.0	51.03	41.5		30.04
Gluconato			85			10	
Sulfato	4.7	5				4	
Colóides							
HES		5%	5%				
PEG						1%	
Impermeabilizantes							
Glucose	190		10			16	
Sacarose							33
Manitol	32		30	30	60		30
Lactobionato		100					
Raffinose		30					
Tampões							
Fosfato	57.6	25	25			0.8	
Histidina				180	30		124
Bicarbonato	9.3					25	
HEPES			10				
Antioxidantes							
Glutathione		3	3		3	3/5.6	
Alopurinol		1	1			1	
Triptofano				2			
Aditivos							
Adenosina		5				5	
Cetoglutarato				1			2
Acido glutâmico					20		
Adenina			5			5	
Piruvato						0.2	
Outros							
Aminoácidos						11	
Vermelho de fenol						0.07	
N-acetilhistidina							57
aspartato							5
glicina							10
alanina							5
Ribose			0.5				
arginina							3
desferoxamina							25
LK614							7.5

Tabela 3 - Principais soluções de preservação e sua composição. (1,10,30)

*A solução Belzer's MPS é apenas utilizada como rotina em técnicas de preservação dinâmica, sendo a única que utiliza o HEPES, um tampão zwitteriônico potente.

5.5.2 Métodos de Preservação dinâmicos

As técnicas dinâmicas requerem movimento de fluido ou gás para facilitar a preservação. Enquanto a máquina de preservação hipotérmica foi um dos primeiros métodos utilizados, a máquina de preservação normotérmica é uma técnica em desenvolvimento nos últimos anos. No grupo das técnicas de preservação dinâmicas inclui-se também a persuflação venosa de oxigénio ou perfusão de oxigénio gasoso.

5.5.2.1 Perfusão Hipotérmica

A máquina de perfusão hipotérmica foi o método de preservação utilizado durante os primeiros anos da transplantação. A primeira tentativa de perfundir um órgão isolado data de 1849 (23). Entretanto, com o desenvolvimento das diferentes soluções de preservação, os resultados obtidos com as técnicas estáticas passaram a ser equivalentes porém, com custos muito mais reduzidos, passando a última a ser a técnica mais utilizada. Nas últimas décadas, o uso de órgãos subótimos (algumas vezes com qualidade comprometida e mais propensos a lesões de isquémia) passou a ser uma realidade e a máquina de perfusão hipotérmica passou a ter de novo interesse.

Na prática, o rim é retirado do dador e colocado num reservatório com uma solução de preservação, e este (reservatório) é colocado numa caixa com gelo. A artéria renal é canulada e uma bomba é usada para gerar um fluxo, pulsátil ou contínuo, da solução de preservação. O fluido sai pela veia renal para o reservatório onde é novamente coletado pela bomba.(8) A bomba pode ser regulada pela pressão ou pelo fluxo, permitindo uma monitorização da resistência renal ao fluxo. A existência deste fluxo permite não só a eliminação de metabolitos como também um arrefecimento uniforme do enxerto. A oxigenação do fluido é também uma opção. O esquema do circuito é representado na Figura 1 . Embora poucos

estudos façam referência, a anatomia vascular parece ser importante para determinar se a máquina de perfusão hipotérmica pode ser usada ou não(32).

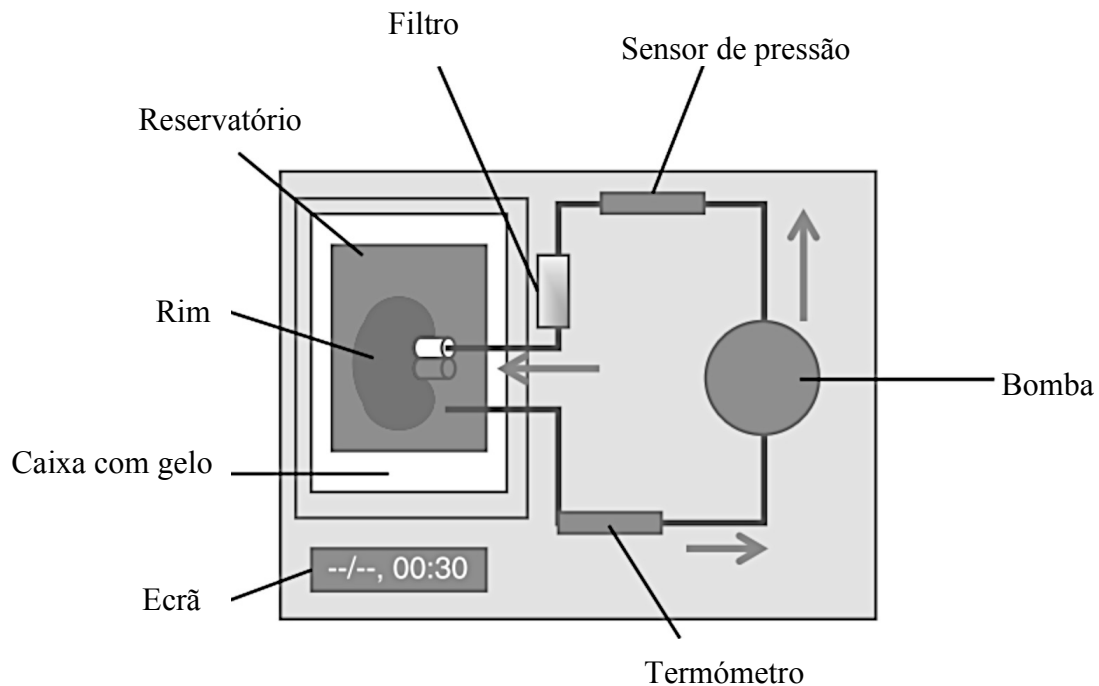


Figura 1 - Representação esquemática da máquina de perfusão hipotérmica. O rim é colocado num reservatório com uma solução de preservação, e este (reservatório) é colocado numa caixa com gelo. A solução é retirada do reservatório e bombeada através da artéria renal. A temperatura, a pressão e a dinâmica do fluido podem ser monitorizadas. (*adaptado de J. O Callaghan (33)*)

O princípio subjacente ao uso desta técnica é a utilização de uma circulação controlada, contínua ou pulsátil, de um perfusato que elimina metabolitos tóxicos e radicais livres e fornece um aporte contínuo de nutrientes, com ou sem fornecimento de oxigénio concomitante. A máquina de perfusão hipotérmica recorre, como o nome indica, às baixas temperaturas (cerca de 10°C) para diminuir o metabolismo, reduzindo as necessidades de oxigénio e o consumo de ATP. A esta temperatura a cadeia de transporte de electrões a nível mitocondrial é mantida e a geração de algum ATP é possível, mantendo o balanço iónico e

ácido base dentro de valores considerados normais, impedindo deste modo o colapso mitocondrial e a sinalização de vias apoptóticas (34). Mesmo em órgãos que já sofreram lesão por isquemia quente, nos quais a cascata de vias apoptóticas já foi iniciada, a MPH pode contribuir para reverter alguns desses eventos(34). Embora esta seja uma forma muito simplista de avaliar os benefícios fisiológicos do uso da MPH, a verdade é que muito há ainda para entender na forma como a sinalização intracelular é influenciada por este tipo de técnica. Entender que tipos de eventos estão envolvidos e em que momento são reversíveis ou irreversíveis com a aplicação da mesma é um desafio.

Uma outra característica importante e que distingue as técnicas dinâmicas da preservação estática em frio é a utilização de um fluxo. A energia para fazer circular o perfusato é criada com recurso a bombas, semi-oclusivas ou de rolete que determinam um fluxo pulsátil e, bombas oclusivas ou centrífugas que determinam um fluxo contínuo(35). A existência de um fluxo permite manter uma estimulação hemodinâmica na árvore vascular do órgão, o que pode desempenhar um papel crítico para a manutenção da função vascular mediante condições semi-fisiológicas, podendo ainda promover uma diminuição do vasoespasma(8,34). Por outro lado, a utilização de um fluxo fornece proteção endotelial, uma vez que este previne não só a ativação do maior órgão endócrino que é o endotélio, como evita o início do *no-reflow phenomenon* (29). Este termo refere-se à lesão endotelial e de reperfusão após isquemia e, ocorre sobretudo a nível dos capilares peritubulares renais, onde se verifica uma desaceleração do fluxo e uma perfusão retrógrada no momento da reperfusão(29). Pensa-se que este fenómeno tenha origem na cessação do fluxo sanguíneo e, deste modo, possa ser prevenido com a manutenção de um fluxo, como é possível com as técnicas dinâmicas. Em parte, este efeito pode dever-se à ativação de genes endoteliais vasoprotetores fluxo-dependentes (KLF2 –inibidor da resposta inflamatória, que produz um

papel determinante na produção de vasodilatadores por parte do endotélio (NO) e expressão de genes anti-trombóticos (trombomodulina)) (23).

Estas consequências na microcirculação estão diretamente relacionadas com os resultados obtidos na transplantação (29). Assim, os benefícios do uso da MPH a este nível parecem ser significativos sobretudo em órgãos sujeitos a um período de isquémia quente (Figura 2) (34).

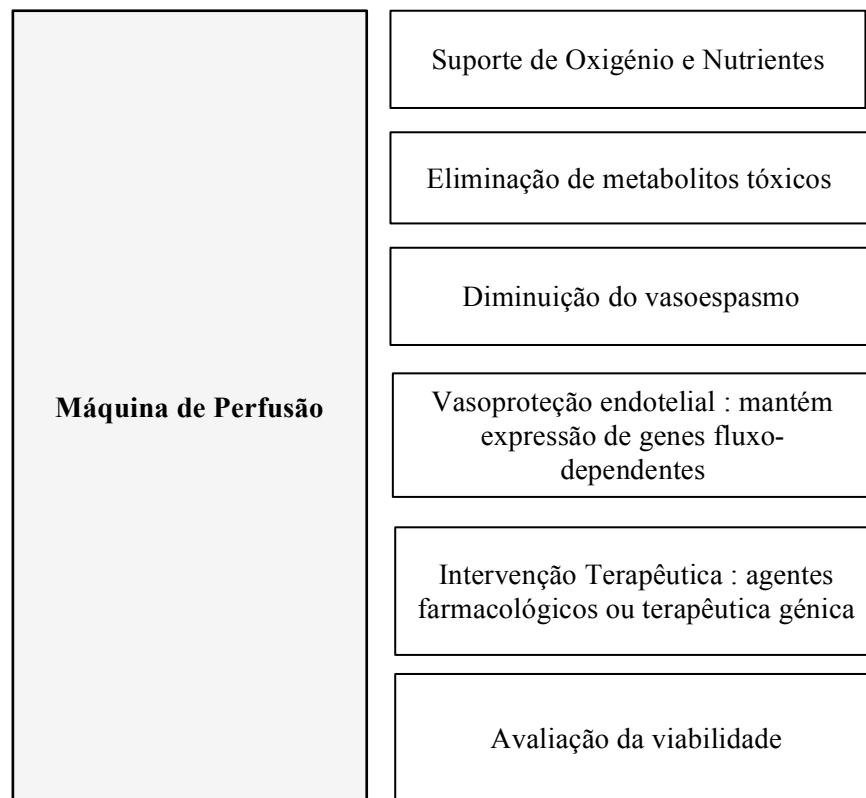


Figura 2 – Principais benefícios atribuídos à máquina de perfusão.

Por falta de estudos em rins, não há resultados concretos quanto há utilização de um tipo de fluxo em detrimento de outro. Muitas variáveis estão presentes e são, na generalidade omitidas na quase totalidade dos estudos publicados. Para entender a influência do tipo fluxo nos resultados obtidos com as técnicas de preservação dinâmica seria importante definir as características do fluxo (velocidade, viscosidade da solução, impedância vascular e características da onda gerada)(29). Há alguma controvérsia quanto ao impacto dos diferentes

tipos de fluxo utilizados em transplante de órgãos sólidos, enquanto uns apresentam resultados semelhantes com o uso de perfusão pulsátil ou contínua, outros demonstraram uma melhoria na função do órgão quando a perfusão pulsátil era utilizada(29).

Tanto o fluxo como a resistência à passagem do fluido podem ter utilidade na avaliação da viabilidade dos órgãos.

Várias máquinas estão disponíveis no mercado (Figura 3), a máquina de perfusão não pulsátil Nikkiso® (Japão), a pulsátil Gampro® (Suécia), Waters®(EUA)(26), LifePort Kindney Transporter (Organ Recovery Systems, Des Plaines, Illinois, EUA) , RM3 (Waters Medical Systems , Birmingham, Alabama, EUA) , Kidney Assist (Organ Assist, Groningen, The Netherlands)(1,35). O LifePort é um dos dispositivos mais utilizados, é portátil e consegue perfundir um rim isolado, sem necessidade de supervisão. Trata-se de um sistema de perfusão contínua que utiliza como solução de preservação a KPS-1® (solução de UW adaptada para perfusão dinâmica). A RM3 é um dispositivo não portátil, capaz de perfundir dois rins em simultâneo e que, ao contrário da anterior, utiliza um fluxo pulsátil. Não há evidências quanto à vantagem em utilizar uma máquina em detrimento de outra.

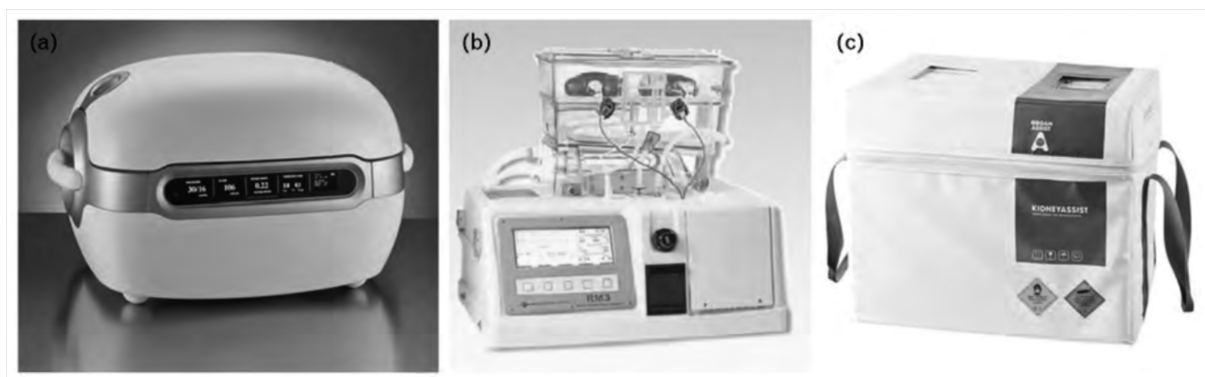


Figura 3 - Principais dispositivos/máquinas de perfusão para preservação de rins.

(a – LifePort Kindney Transporter ; b - RM3; c- Kidney Assist)

As variáveis que contribuem para os resultados obtidos em transplantação são inúmeras, seja qual for a técnica aplicada. Porém, quando falamos deste tipo de preservação várias questões se levantam: desde a já abordada, qual o tipo de fluxo a aplicar? Qual a melhor solução de preservação? Qual a duração da perfusão? Que tipo de aditivos ao perfusato devem ser utilizados e em que situações?

Quanto às soluções de preservação utilizadas nas técnicas dinâmicas, estas derivam das soluções utilizadas na preservação estática em frio. Com efeito, desde cedo que o edema intersticial e celular tem sido associado a um aumento da resistência capilar, o que levou ao desenvolvimento de soluções de preservação com propriedades oncóticas ainda mais significativas. Inicialmente fez-se uso de derivados de albumina, mais tarde passou a recorrer-se a derivados de plasma humano até aos dias de hoje, com a adição de hidroxietileno (HES). A solução hoje em dia mais utilizada é a de Belzer-MPS e apenas usada na preservação dinâmica de rotina. Em comparação com as soluções referidas anteriormente para preservação estática, esta apresenta concentrações iónicas semelhantes à Celsior, uma concentração de gluconato superior àquela que encontramos no Polysol, uma concentração de manitol semelhante à HTK e 5% de HES como na solução UW(8,29) (tabela 3). Esta solução contém ainda ribose e um tampão orgânico zwitteriónico(29) (HEPES, ácido etanosulfónico 4-2-hidroxietil piperazina-1, um dos tampões mais utilizados em experiências biológicas com uma incrível capacidade de controlar o pH entre 6.8 e 8.2. Outra incrível propriedade do HEPES prende-se com o facto de que o seu pKa varia com a temperatura, sendo a sua dissociação menor a baixas temperaturas). Existe na literatura muito pouca informação, sobretudo comparativa, no que diz respeito às soluções de preservação utilizadas com a máquina de perfusão hipotérmica.

Quanto à duração da preservação sabe-se que este tipo de técnicas apresenta mais benefício em preservações de longa duração, especialmente em órgãos que já foram submetidos a um período de isquemia (36).

A questão major a respeito das técnicas de preservação de enxertos para transplante renal é entender até que ponto este tipo de técnica apresenta melhores resultados do que a preservação com a técnica padrão, a preservação estática em frio. Face a esta hipótese, muitos estudos têm tentado comparar os resultados obtidos com a máquina de perfusão hipotérmica com os resultados obtidos com a preservação estática em frio (Tabela 4 e 5). A maior parte destes estudos mostra benefícios quando os órgãos são perfundidos via máquina de perfusão hipotérmica(2,32,37–41), apresentando estes melhores resultados no que diz respeito à função tardia do enxerto, comparativamente com órgãos submetidos a preservação estática.

O maior estudo realizado até à data, em 2009, (38) comparou os resultados de 336 rins preservados com MPH com 336 rins preservados com PEF. Neste, verificou-se uma redução significativa da função tardia do enxerto (20.8% vs 26.5% $p=0.05$), e um aumento da sobrevivência do enxerto a um ano dos órgãos submetidos a MPH comparativamente com PEF (94% vs 90% $p= 0.04$). O grupo apresentou ainda os resultados em função do tipo de doadores, porém as diferenças entre doadores padrão e doadores com critérios alargados não foram estatisticamente significativas ($p=0.75$). O mesmo aconteceu quando compararam rins de doadores em morte cerebral com rins de doadores em morte circulatória ($p= 0.42$).

Contudo, os resultados são ainda contraditórios, num estudo multicêntrico realizado no Reino Unido, Watson et al (7) compararam igualmente resultados entre MPH e preservação em PEF de um conjunto de rins de doadores após morte circulatória. Neste estudo concluíram que, para este tipo de doadores, a máquina de perfusão hipotérmica não oferece vantagens relativamente à preservação estática em frio. Os resultados pareceram transversais às várias variáveis em estudo, com uma função tardia do enxerto superior no grupo preservado com

MPH comparativamente ao PEF (58% vs 56% $P=0.99$), uma sobrevivência do enxerto a um ano inferior (93.3% vs 97.8% $p=0.03$), bem como uma sobrevivência dos pacientes também inferior (93% vs 100% $p=0.08$). Um dos motivos para os resultados aparentemente contraditórios pode ser o facto de que neste último estudo os rins provinham exclusivamente de dadores em morte cardíaca, ao contrário de outros em que a maior parte dos dadores eram dadores em morte cerebral. Apesar de os rins em morte cerebral serem expostos a uma quantidade significativa de influências hormonais, não incorrem no período de isquémia quente a que os rins de dador em morte circulatória estão sujeitos.

No que diz respeito à sobrevivência do enxerto, em geral, a máquina de perfusão hipotérmica demonstrou resultados ainda mais notáveis quando a respeito de órgãos nos quais ocorreu função tardia do enxerto. O estudo de Treckman et al (39) mostrou que no grupo preservado com MPH, há uma diferença de 10% na sobrevivência do enxerto a um ano quando ocorre função tardia do enxerto quando comparada com a sobrevivência a um ano dos rins com função imediata (94% vs 85% $p=0.164$). Quando ocorre função tardia do enxerto no grupo PEF, o efeito na sobrevivência do enxerto é marcado, a registar uma diferença de 41% vs 97%.

Se apenas forem analisados os órgãos que desenvolveram função tardia do enxerto, a diferença na sobrevivência do enxerto a um ano é estatisticamente significativa (MPH=85% PEF=41% $p=0.003$).

Apesar da maioria dos estudos analisados apresentar diferenças estatisticamente significativas no que se refere a uma diminuição da função tardia do enxerto com o uso da MPH, no que toca a sobrevivência do paciente ou sobrevivência do enxerto a um ano, embora maior com a MPH, a diferença entre os dois grupos não é estatisticamente significativa (tabela 4 e 5).

Os melhores resultados a curto prazo obtidos com esta técnica, como a diminuição da função tardia do enxerto e falência do enxerto, refletem-se também em melhores resultados a nível económico (6). A redução nestes eventos traduz-se numa menor necessidade de terapêutica dialítica pós-operatória e num internamento de duração mais reduzida, ambos representando custos significativos. Esta redução é ainda mais significativa quando os órgãos de dadores com critérios alargados são analisados (6). A máquina de perfusão hipotérmica é uma técnica de preservação custo-efetiva, com custos por ano de vida mais baixos e reduzidos custos por QALY, comparativamente com a preservação estática (6).

Apesar dos resultados positivos, continuam a ser necessários mais estudos que permitam esclarecer em que tipos de dador esta deva ser a técnica de eleição. Existem também algumas falhas que devem ser colmatadas e que podem ajudar a esclarecer os benefícios da MPH, como a heterogeneidade dos estudos, sobretudo quanto ao tipo de dadores da amostra, amostras pequenas, falta de relatos quanto aos aditivos usados no perfusato e quanto aos parâmetros usados pela máquina, nomeadamente a pressão.

Estudo	Ano	Tipo de dadores	Tipo de estudo	Média tempo de isquemia (h)		Modelo de MPH	Solução utilizada	Nº de Rins		Função tardia do enxerto			Disfunção do enxerto		
				PEF	MPH			PEF	MPH	PEF	MPH	p	PEF	MPH	p
Plata-Munoz(2)	2008	DMCirc	Coorte	17.9	18.6	LifePort	Marshall	30	30	25 (86.6%)	16 (53.3%)	<0.0000	0	0	-
Moustafellos(37)	2007	DMCirc	Retrospectivo	16.7	15.2	LifePort	UW	18	18	16 (88.8%)	5 (28.8%)	0.0002	-	-	-
Watson et al(7)	2010	DMCirc	Múltiplo	14.4	13.9	LifePort	UW	45	45	25 (56%)	26 (58%)	0.99	0	1	-
Moers et al(38)	2009	MC ou DMCirc	Randomizado	15.9	15	LifePort	UW/HTK	336	336	89 (26.5%)	70 (20.8%)	0.05	4.8%	2.1%	0.08
Treckmann et al(39)	2011	DCA	Randomizado	9/10	10	LifePort	UW/HTK	91	91	27 (29.7%)	20 (22%)	0.27	12%	3%	0.04
Kwiatkowaki(40)	2009	MC	Randomizado	-	-	Waters MOX-100	-	37	37	17 (50%)	11 (32.4%)	-	-	-	-
I. Jochmans(41)	2010	DMCirc	Randomizado	15.9	15	LifePort	UW/KPS-1	82	82	57 (69.5%)	44 (53.7%)	0.007	2.4%	2.4%	1
Anja Gallinat(32)	2012	DCA	Randomizado	11	10.5	LifePort	UW/HTK	85	85	34.1%	29.4%	0.58	12.9%	3.5%	0.02

Tabela 4 - Principais estudos comparativos entre os resultados obtidos com máquina de perfusão hipotérmica vs preservação estática em frio

Estudo	Ano	Tipo de dadores	Tipo de estudo	Nº de Rins		Hospitalização		Nº/Duração da diálise (dias)				Sobrevivência do enxerto a 1 ano			Sobrevivência do paciente a 1 ano		
				PEF	MPH	PEF	MPH	PEF		MPH		PEF	MPH	p	PEF	MPH	p
								Nº	Dias	Nº	dias						
Plata-Munoz(2)	2008	DMCirc	Coorte	30	30	14	10	-	-	-	-	93%	100%	ns	93%	100%	ns
Moustafellos(37)	2007	DMCirc	Retrospectivo	18	18	14.1	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Watson et al(7)	2010	DMCirc	Múltiplo	45	45	-	-	26	5	25	7	98%	93.3%	0.3	100%	93%	0.08
Moers et al(38)(42)	2009	MC ou DMCirc	Randomizado	336	336	18	19	-	-	-	-	90%	94%	0.04	97%	97%	0.04
Treckmann et al(39)	2011	DCA	Randomizado	91	91	-	-	-	-	-	-	80.2%	92.3%	0.02	96.7%	93.4%	0.30
Kwiatkowaki(40)	2009	MC	Randomizado	37	37	-	-	-	-	-	-	86.4%*	94%*	-	-	-	-
I. Jochmans(41)	2010	DMCirc	Randomizado	82	82	-	-	-	-	-	-	95.1%	93.9%	-	97.6%	96.3%	-
Anja Gallinat(32)	2012	DCA	Randomizado	85	85	23	21	-	-	-	-	81%	89%	0.139	95%*	94.2%*	0.79

Tabela 5 - Principais estudos comparativos entre os resultados obtidos com máquina de perfusão hipotérmica vs preservação estática em frio

*cálculo efetuado a partir da perda de enxerto/morte a um ano.

O estudo de Trechmann (35) apresenta ainda valores referentes apenas aos que registaram função tardia do enxerto, PEF=85% vs MPH 41% p=0.003. No grupo preservado com MPH, há uma diferença de 10% na sobrevivência do enxerto a um ano quando ocorre função tardia do enxerto quando comparada com a sobrevivência a um ano dos rins com função imediata (94% vs 85% p=0.164). Quando ocorre função tardia do enxerto no grupo PEF, o efeito na sobrevivência do enxerto é marcado (41% vs 97%).

5.5.2.2 Perfusão Normotérmica

Desde os primórdios da transplantação que os órgãos são preservados com recurso à hipotermia. Embora o arrefecimento dos órgãos tenha muitos aspetos positivos tem também efeitos deletérios. Neste sentido, as técnicas de perfusão normotérmica oferecem uma alternativa na preservação e recuperação de enxertos tendo, por esse motivo, vindo a ser gradualmente adotadas na prática clínica em transplante de órgãos sólidos (43).

O elemento-chave da preservação normotérmica é a manutenção do rim num estado semelhante ao seu estado fisiológico isto é, dentro de uma temperatura próxima dos 37°C, fornecendo-lhe ao mesmo tempo oxigénio e nutrientes para suportar o metabolismo aeróbio. (35,44) Deste modo, a perfusão normotérmica minimiza os efeitos deletérios da isquémia-reperfusão e permite não só a preservação como também a recuperação funcional do órgão. A perfusão normotérmica pode ser aplicada de três formas diferentes:

1. Perfusão Normotérmica Regional (PNR), imediatamente antes da colheita do órgão em dadores em morte circulatória;
2. Máquina de Preservação Normotérmica (MPN), durante o período de preservação propriamente dito;
3. Recondicionamento Normotérmico (RN), durante um curto período imediatamente antes da implantação do órgão.

5.5.2.2.1 Perfusão Normotérmica Regional

A manutenção da circulação à temperatura corporal ou temperatura ambiente usando um suporte extracorpóreo de oxigenação por membrana (ECMO) por um período de tempo antes do arrefecimento *in-situ* define o que designamos de Perfusão Normotérmica Regional (44).

Também conhecida como condicionamento do dador, esta técnica mantém uma perfusão semifisiológica de sangue autólogo termorregulado. Esta é conseguida através da colocação de um balão oclusivo na aorta descendente, limitando a circulação aos órgãos abdominais(10,45). Estudos comparativos entre perfusão hipotérmica e perfusão normotérmica regional mostraram que a incidência de função tardia do enxerto e disfunção primária do enxerto foram significativamente menores com a última (46,47). A sobrevivência a 5 anos para órgãos de dadores em morte circulatória submetidos a PNR mostrou ser equivalente à sobrevivência de órgãos de dadores vivos ou de dadores em morte cerebral(46).

Segundo o estudo de Magliocca et al (47) o uso de perfusão normotérmica regional com recurso ao ECMO em dadores após morte circulatória aumentou em 33% o *pool* de potenciais dadores com resultados a curto prazo semelhantes aos obtidos com rins de dadores em morte cerebral. O potencial aumento associado a esta técnica pode ser decorrente da sua capacidade em otimizar órgãos que até à data eram considerados como subóticos, fazendo destes uma possibilidade para expandir o número de transplantes realizados. Embora mais utilizada em normotermia, esta técnica pode também ser aplicada em hipotermia (tabela 6).

Potenciais benefícios da perfusão regional

Hipotérmica

- Mais eficiente arrefecimento do órgão
- Redução do tempo de isquémia quente
- Troca de gás contínua durante a recuperação do órgão e repleção das reservas de energia celulares

Normotérmica

- Restaura o metabolismo e processos celulares normais antes da isquémia fria
 - Repleção das reservas energéticas celulares
 - Redução dos produtos de degradação nucleotídica
 - Indução de antioxidantes endógenos
 - Redução dos efeitos vasoconstritores da hipotermia
 - Avaliação compreensiva da viabilidade antes da recuperação
-

Tabela 6 - Benefícios da perfusão regional em hipotermia e normotermia

5.5.2.2 Máquina de Perfusão Normotérmica

A máquina de perfusão normotérmica tem surgido como uma transição das atuais técnicas utilizadas.

Segundo esta técnica, o rim é colocado dentro de uma câmara a partir da qual o efluente venoso pode ser recolhido e o fluido urinário pode ser drenado através do uréter. A artéria renal é canulada para fornecer um fluxo sanguíneo ou de perfusato contínuo e recirculado. O sistema incorpora, em regra, uma bomba, um oxigenador, e um sistema de aquecimento(8). Em alguns casos as máquinas utilizadas na perfusão hipotérmica são adaptadas, noutros casos são usadas máquinas que recorrem a circuitos semelhantes aos usados na diálise, permitindo estas um controlo otimizado da função renal. Porém,

dispositivos mais elaborados, especificamente desenhados para o efeito também estão disponíveis, como é o caso do IPOS (sistema de preservação de órgão isolado – Figura 4) (44). Este conhecido sistema evoluiu a partir da máquina de bypass cardiopulmonar pediátrica usada em muitos estudos experimentais (48).

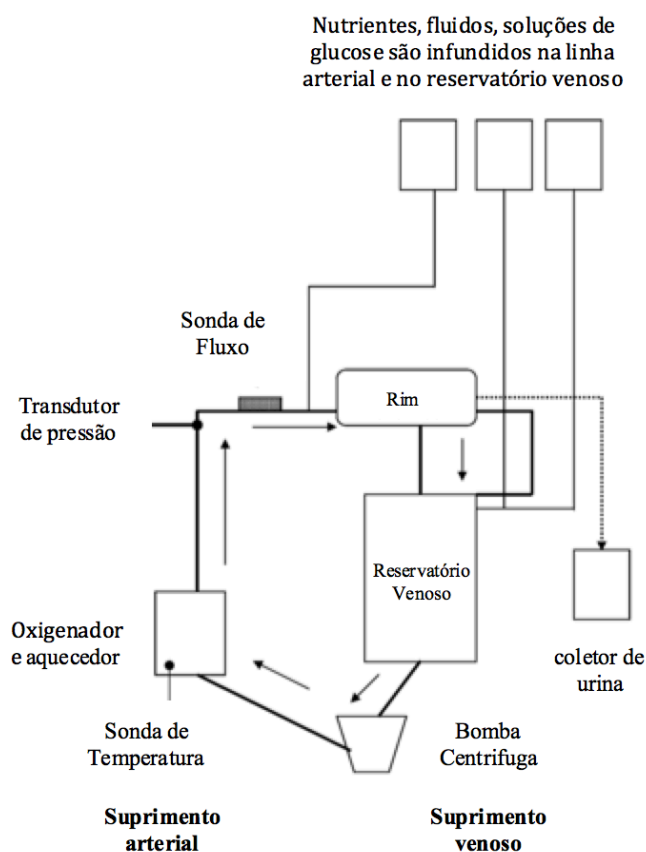


Figura 4 - Diagrama esquemático do sistema de preservação de órgão isolado. As setas indicam a direção do fluxo sanguíneo ou do substituto utilizado.

À parte de ter a maquinaria disponível, a composição do perfusato é uma parte vital desta técnica. É responsabilidade do mesmo garantir uma entrega adequada de nutrientes e oxigénio por forma a manter a integridade celular e vascular (44).

Uma solução semelhante ao sangue é a escolha mais natural, uma vez que os glóbulos vermelhos são, por si só, um excelente transportador de oxigénio. Contudo, pode ocorrer hemólise, ativação plaquetar e degradação de produtos durante a perfusão. Estes efeitos devem-se principalmente ao aumento da resistência e do edema tecidular, sendo sobretudo evidentes durante períodos de preservação mais prolongados (43). Em todo o caso, o atual recurso a bombas e a oxigenadores faz com que este seja, ainda hoje, um perfusato seguro quando a respeito de curtos tempos de preservação (49). De destacar que os leucócitos são, dos componentes celulares do sangue, os maiores intervenientes na lesão por isquémia e por isso a depleção de leucócitos é um passo importante. O recurso a sangue do Banco de Sangue deixa de parte esse problema uma vez que esse sangue é naturalmente depletado de leucócitos. Além desta depleção, seria também importante tentar o uso de sangue com frações menores de complemento.

Um alternativa é o uso de substitutos, essencialmente perfluorocarbonetos (PFCs) ou soluções semelhantes à hemoglobina.

O Perflurobon, emulsão de perfluorocarbonetos, foi a primeira solução acelular desenvolvida para utilização em preservação normotérmica. Esta é semelhante a um meio de cultura enriquecido com aminoácidos essenciais e não essenciais, lípidos e carboidratos(43).

A propriedade mais reconhecida deste tipo de soluções é a sua grande capacidade em dissolver oxigénio, cerca de 25 vezes superior ao sangue ou à água (44). Porém, eram tidas como bastante instáveis e incapazes de ser esterilizadas, além de um conjunto de efeitos adversos como hipotensão, anafilaxia e ativação do complemento (1ª geração de PFCs) (43). Novas investigações têm vindo a ser feitas e estão já disponíveis PFCs de segunda e terceira

geração, mais estáveis e com menos efeitos secundários. Exemplo disso é o Oxygent, um PFC de terceira geração, que diferente de outros PFCs possui também a capacidade de minimizar os efeitos deletérios associados ao período de isquémia quente, através da possibilidade de infusão retrógrada via uréter (50). Hoje em dia já usado comercialmente, porém pouco difundido essencialmente devido aos custos associados.

Em geral, os PFCs são capazes de libertar oxigénio a favor de um gradiente de concentração, independentemente da temperatura, criando um ambiente altamente oxigenado. Uma vantagem deste tipo de soluções é o facto de poderem ser adicionados à solução de preservação utilizada em preservações estáticas numa técnica chamada de método das duas camadas (10,34,51). Este método é assim denominado em função das duas camadas que se formam fruto das diferentes densidades dos seus constituintes, o PFC em baixo e a solução de preservação em cima. O órgão é então colocado na solução e permanece entre as duas camadas. Uma das limitações é a dificuldade em fazer penetrar o oxigénio e a solução em profundidade, sobretudo em órgãos capsulados como é o caso do rim (52).

No que diz respeito ao uso de PFCs em sistemas de perfusão contínua, embora tenha sido incentivado, sobretudo no início da utilização de substitutos em perfusão normotérmica, a sua utilização é limitada fruto da sua instabilidade e dos efeitos adversos (51).

Outro grupo de substitutos utilizados são as soluções com transportadores de oxigénio semelhantes à hemoglobina (*hemoglobin-based solutions*). Um exemplo é a *Lifor*, uma solução que contém um transportador de oxigénio não proteico, nutrientes e fatores de crescimento (43). Tem sido reconhecida pelos seus benefícios em diminuir a apoptose, sobretudo após lesões isquémicas. Apesar da toxicidade associada ao seu uso ser marcada, os estudos em rins humanos são ainda limitados (44). Outro exemplo é a AQIX-RS-I, uma solução não tamponada por fosfato, em que a sua composição se baseia nas concentrações iónicas fisiológicas, determinando osmolaridade e condutividade iónica semelhantes às

normais, permitindo manter a integridade das membranas e a atividade enzimática das células, suportando deste modo o metabolismo e atividade celular a temperaturas normais (44). Neste caso, o transporte de oxigênio é feito por dissolução ou, em alguns casos, pode também misturar-se glóbulos vermelhos.

Dentro deste grupo, a solução mais recente é a Hemoxycarrier, a qual faz uso de uma molécula promissora que é a Hemarina-M101, uma hemoglobina extracelular derivada de um invertebrado marinho(51). Este pigmento respiratório tem elevada afinidade pelo oxigênio e marcada atividade antioxidante, funcionando numa amplitude térmica entre 4-37°C, o que possibilita, em teoria, o seu uso tanto em normotermia como em hipotermia (44). Apesar de tudo, ainda não existem dados conclusivos quanto ao seu uso em normotermia e em rins humanos.

Muitas das vezes um período de perfusão normotérmica é combinado com um período de perfusão hipotérmica ou com um período de preservação estática. Os rins submetidos a este tipo de estratégia registaram menos lesão tubular, aumentaram o fluxo sanguíneo e a oxigenação e eram mais estáveis do que aqueles que foram preservados com recurso a hipotermia (53).

Até à data poucos estudos em humanos comparam esta técnica com as demais. No estudo de Nicholson e Hosgood (54), o uso de perfusão normotérmica ex-vivo em órgãos de dadores com critérios alargados demonstrou uma diminuição na função tardia do enxerto quando comparado com os métodos de preservação estática em frio (5.6% vs 36.2%), embora não registassem diferenças na sobrevivência a 1 ano do enxerto ou do paciente.

Permanece em aberto a discussão se as vantagens oferecidas por este tipo de preservação e o número efetivo de rins que se conseguem preservar e recuperar com a mesma, que eventualmente seriam descartados com as demais, contrabalançam os custos associados à mesma.

5.5.2.2.3 Recondicionamento Normotérmico

O uso de um período de perfusão normotérmica imediatamente antes do implante do órgão no recetor é chamado de recondicionamento normotérmico e parece ser efetivo em melhorar a função renal, sobretudo em rins que sofreram um período de isquémia quente (8).

Uma vantagem de restaurar o metabolismo celular durante a preservação é a possibilidade de manipular/ tratar/ otimizar o rim antes do transplante, o que em rins de doadores com critérios alargados ou de doadores por morte cardíaca parece ser uma mais valia.

Nicholson e Hosgood (54) concluíram que um período de perfusão normotérmica em rins 60 minutos antes de serem implantados no dador parece ter efeitos benéficos, embora a duração considerada ótima ainda não tenha sido determinada. Este curto período de tempo é suficiente para restaurar os níveis de ATP e a função renal, sem atrasar o processo de transplante.

5.5.2.3 Persuflação Venosa de Oxigénio

A persuflação de oxigénio é uma técnica simples através da qual o oxigénio filtrado e humidificado é instilado diretamente nos vasos renais. O gás é depois libertado por pequenos poros na superfície do rim (51). A persuflação pode efetivamente fornecer oxigénio ao rim e suportar o metabolismo aeróbio, sendo isso comprovado pela geração de ATP durante o período de preservação (29). Este método mostrou excelentes resultados na recuperação de órgãos de dador em morte cardiocirculatória (30).

5.6 Oxigenação em preservação de enxertos

No passado, acreditava-se que a oxigenação era um componente essencial da preservação como forma de manter o metabolismo celular e prevenir lesões de isquémia. No entanto, com a introdução das modernas soluções de preservação e a adoção da preservação estática em frio como técnica padrão, o oxigénio deixou de ser visto como fundamental e tem vindo a ser cada vez menos utilizado durante a preservação (51). Entretanto, como aconteceu com a máquina de perfusão, a mudança nas características do *pool* de dadores, motivou também o revisitar da oxigenação durante a preservação.

Hoje em dia, os resultados comparativos entre séries preservadas com e sem oxigenação são divergentes. No entanto, a oxigenação pode ser particularmente benéfica em rins que sofreram lesão por um período de isquémia quente ou isquémia fria (51). A máquina de perfusão, em particular em normotermia, ou a persuflação retrógrada têm sido as técnicas de escolha para a sua aplicação.

A oxigenação deve ser utilizada de forma seletiva uma vez que os benefícios da mesma, sobretudo em condições de hipotermia não são homogéneos, particularmente no caso de rins com lesões de isquémia mínimas os quais podem não beneficiar de oxigenação (29,36,51).

Apesar de todos os possíveis efeitos benéficos da oxigenação, um aumento do oxigénio disponível pode levar à formação de espécies reativas de oxigénio (34), razão pela qual fixadores de radicais livres/antioxidantes (superóxido dismutase) devem ser adicionados à solução de preservação (30,51).

Embora a hipotermia aumente a solubilidade do oxigénio, o aumento das cargas elétricas devido à presença de agentes oncóticos no perfusato, diminui o coeficiente de solubilidade de algumas moléculas apolares, como é o caso do oxigénio (29). Uma opção para contornar este tipo de problema é a utilização de oxigenação hiperbárica (29,51). Embora a oxigenação hiperbárica tenha demonstrado benefício quando aplicada antes de retirar o órgão do dador e

durante a perfusão, como forma de regular em baixa os processos de isquemia reperusão, esta técnica não é aplicada de forma regular (51).

Um período de perfusão com oxigenação após preservação estática em frio tem sido utilizado para recuperar e condicionar órgãos, corrigindo os défices de ATP, reduzindo o stress oxidativo e melhorando a viabilidade (51).

5.7 Avaliação da Viabilidade do enxerto

A avaliação da viabilidade do enxerto tem vindo a tornar-se cada vez mais importante a par do aumento do uso de órgãos de dadores marginais (54). A associação destes órgãos a maiores taxas de função tardia do enxerto, disfunção primária e perda do enxerto é também inevitável. Desta forma, diariamente é colocada a questão: aceitar ou não aceitar determinado órgão para transplante? É certo que obter uma resposta segura é algo que ainda hoje é muito complicado. Não há uma forma objectiva, sólida e com acurácia suficiente que permita uma avaliação exata do risco de função tardia do enxerto, disfunção ou até mesmo de perda do enxerto.

Em teoria, a avaliação da viabilidade pode ser feita durante o processo de preservação, antes de retirar o rim do possível dador ou após o implante do rim no receptor.

5.7.1 Avaliação da viabilidade antes da colheita do enxerto

A ideia de que as características do dador estão diretamente relacionadas com a qualidade do órgão e, assim, com os resultados obtidos com o transplante do mesmo, acompanhou a transplantação desde sempre. Contudo, é muitas vezes difícil de objetivar que características são essas e de que forma é que elas afetam o órgão a ponto de influenciar os resultados obtidos no transplante.

A classificação de alguns dadores como dadores com critérios alargados (definidos anteriormente), reduziu, à partida, uma grande parte dos órgãos que até então eram descartados. Entretanto, vários *scores* de risco têm vindo a ser desenvolvidos por forma a tentar uma avaliação mais objectiva.

O *Deceased Donor Score* classifica os rins em 4 categorias (A-D), para esta classificação combina a idade, a história de hipertensão, *clearance* da creatinina, compatibilidade HLA e a

causa de morte do dador(55). O uso deste *score* apresenta uma relação mais estreita com o risco de função tardia do enxerto ou sobrevivência do enxerto quando comparado com a simples classificação como dador com critérios alargados (56).

O *Donor Risk Score*, mais recente, categoriza os rins em 5 categorias (I- V) através da utilização de 10 factores de risco para sobrevivência do enxerto: idade do dador, raça, história de hipertensão ou diabetes, causa de morte, tempo de isquémia fria, HLA-A/B/DR e incompatibilidade (55).

Em 2009 foi desenvolvido um novo *score*, *Kidney Donor Risk Index*, este consiste numa fórmula na qual são introduzidos todos os factores de risco do dador e do receptor. O resultado encontrado estabelece uma comparação relativa entre o possível candidato a transplante e um dador / receptor de referência (55).

Embora os *scores* possam ser um bom meio auxiliar para a tomada de decisões, a sua capacidade preditiva continua a ser baixa. Decisões clínicas de aceitar ou rejeitar determinado enxerto devem por isso ser sempre decisões integradas, com a noção de que muitas das vezes uma alteração apenas num dos parâmetros pode representar a diferença entre o *score* predizer uma determinada probabilidade de função tardia do enxerto em função de outra, que pode induzir em decisões clínicas completamente diferentes.

5.7.2 Avaliação da viabilidade durante a preservação do enxerto

As biópsias renais pré-transplante são muitas vezes realizadas em órgãos de dadores mais velhos e são uma causa major de rejeição de órgãos para transplante (55). Um dos grandes achados à biópsia que motiva esta rejeição é o grau de glomeruloesclerose, sendo o *cut-off* de 20% o utilizado pela grande maioria dos centros (57) . É plausível que, embora a biópsia seja um método de observação direta do órgão, seja também um método muito questionável. Até

que ponto é que um conjunto de fragmentos refletem o estado global do órgão e até que ponto é que não é uma técnica muito dependente do patologista? Até que ponto é que esta reflete danos vasculares imperiosos?

Em todo o caso, rins de doadores com mais de 60 anos submetidos e selecionados tendo em conta a biópsia pré-transplante têm uma sobrevivência semelhante à de rins de doadores jovens e, uma sobrevivência maior quando comparada com rins de doadores com mais de 60 anos selecionados apenas com base em critérios clínicos (55).

Além do eventual benefício em diminuir a função tardia do enxerto em rins de doadores subótimos ou sujeitos a longos períodos de isquémia, a máquina de perfusão oferece a oportunidade de avaliar a viabilidade desses órgãos. Essa avaliação pode ser feita tanto através de biomarcadores na solução de preservação, como através de parâmetros mecânicos fornecidos pela máquina.

Dentro dos parâmetros fornecidos pela máquina, a pressão e o fluxo são fáceis de monitorizar sendo, por isso, frequentemente utilizados. A resistência renal é dada pelo *ratio* entre a pressão de perfusão e o fluxo renal, sendo deste modo inversamente proporcional ao fluxo. A resistência no final da máquina de perfusão é um fator de risco independente para o desenvolvimento de função tardia do enxerto, independentemente do tipo de dador (55). Rins com baixo fluxo e uma alta resistência são menos perfundidos e menos bons para transplante (30).

A média do fluxo é atingida pelas 2 horas de perfusão, a resistência após 2 horas ou mais é preditiva de função tardia do enxerto, enquanto a resistência inicial é preditiva de sobrevivência do enxerto a um ano (58).

Um dos problemas levantados é o facto de não se saber qual a duração de perfusão mais adequada. Tal facto pode culminar com a obtenção de valores de resistência que levem a uma descarga de órgãos em situações em que ainda não tenha decorrido tempo suficiente para que

o fluxo atinja um valor aceitável(58), uma vez que os rins tendem a diminuir a resistência e a aumentar o fluxo com o passar do tempo. Por outro lado, a uma tentativa de períodos de perfusão mais longos corresponde também um maior tempo de isquemia e a duração ideal da perfusão é ainda um ponto que permanece pouco esclarecido.

Nos EUA, os parâmetros de perfusão são responsáveis por uma rejeição anual de 15% dos rins submetidos a este tipo de preservação, a maior parte por valores elevados de resistência (57). Contudo, a capacidade preditiva dos parâmetros fornecidos pela máquina, por si só, não é suficiente para aceitar ou rejeitar um rim pré-transplante (35,55).

Numa outra vertente, pensa-se que a concentração de biomarcadores no perfusato possa estar relacionada com os resultados do enxerto (55). Os biomarcadores correspondem a moléculas, na maior parte dos casos enzimas, que resultam do *washout* efectuado pelo perfusato. Consistem em agentes libertados aquando do dano tecidual, proteínas associadas a inflamação, radicais livres ou moléculas com potencial redox.

Uma grande quantidade de marcadores tem sido associada a lesão renal: Lactato desidrogenase (LDH), alanina aminopeptidase (Ala-AP), glutathione-S-transferase (GST), aspartato aminotransferase (AST), produtos de peroxidação lipídica (LPOP), proteína ligante de ácidos gordos do tipo cardíaca (H-FAB), N- acetil- β - D- glucosaminidase (NAG), fosfatase ácida, interleucina 18 (IL-18), lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (NGAL)(59). Só a GST, NAG e H-FAB foram reconhecidos como fatores de risco independentes para função tardia do enxerto, mas não o foram para disfunção primária ou sobrevivência do enxerto (60).

Não há relação entre a informação fornecida pelos biomarcadores e a resistência durante a preservação, sugerindo que podem refletir aspetos diferentes (55). Assim, eles devem ser usados em combinação e conjugados com a informação clínica. Nenhum parâmetro isolado é sensível o suficiente para predizer com segurança a qualidade do enxerto (10).

As novas abordagens para a avaliação da viabilidade pré-transplante utilizam métodos de imagem e consistem no uso da ecografia contrastada e da ecografia tridimensional durante a perfusão pela MPH. Apresentam-se como uma forma rápida, bem tolerada, asséptica e não invasiva de avaliar a viabilidade, contudo apenas testadas em modelos animais (59).

Uma outra abordagem para avaliação da viabilidade é o uso da ressonância magnética espectral ou espectroscopia por ressonância magnética (RME). Esta, utilizada antes para avaliar lesões de isquemia, permite traçar o perfil metabólico do perfusato, o qual pode ser preditivo dos resultados obtidos com o enxerto (10). Esse perfil metabólico é calculado com base no “*chemical shift*” durante a perfusão com o uso de ^1H (espectroscopia de prótons) e ^{31}P -RME (espectroscopia do fósforo por ressonância magnética) (59). A última tem mais interesse na medida em que permite avaliar os níveis de ATP sobretudo em rins não sujeitos a isquemia quente, quando a tensão de O_2 na solução de preservação é adequada.

Testes incluindo função das células renais e tubulares, ou avaliação das mudanças no peso do órgão podem ser usados em simultâneo para uma avaliação mais abrangente da condição do rim (44).

A perfusão normotérmica pode oferecer uma mais acurada avaliação da viabilidade comparativamente com perfusão hipotérmica (44,55), uma vez que com a última o metabolismo celular é sustentado.

5.8 Manipulação do enxerto

A manipulação do enxerto levanta ainda muitas questões. Provavelmente, a mais relevante é saber qual o melhor *timing* para tentar melhorar ou tratar eventuais danos. As opções de intervenção no que diz respeito à manipulação do enxerto são possíveis a diferentes níveis como demonstrado na figura 5.

Dador	<ul style="list-style-type: none">• Pré-condicionamento isquémico• Circulação normotérmica regional
Durante a Preservação	<ul style="list-style-type: none">• Conteúdo da solução de preservação (polietileno glicóis)• Máquina de Perfusão (oxigénio, temperatura)• Suplementação farmacológica (inflamação, coagulação, metabolismo energético, oxigénio)• Modulação da expressão génica (siRNA)
Recetor	<ul style="list-style-type: none">• Terapêutica Celular (adipócitos, amniócitos, células estaminais)• Pós-condicionamento (eritropoietina, adenosina)

Figura 5 - Terapêuticas de manipulação do enxerto em função dos diferentes níveis de atuação: no dador, durante a preservação e no recetor. (Adaptado de Delphine Bon (10))

Os principais objetivos, seja qual for a fase em que se tente intervir é a evicção das principais características associadas a lesão crónica do enxerto como atrofia tubular, fibrose intersticial, espessamento da íntima dos vasos e glomeruloesclerose, sendo a isquémia-

reperusão um complexo com um papel decisivo no iniciar de qualquer um destes tipos de processos.(13)

O primeiro nível de atuação possível ou o mais precoce é tido quando o rim está ainda no dador e consiste em tentar evitar ou modular os efeitos deletérios induzidos pela morte do dador no órgão para transplante. A este nível os cuidados prendem-se, por exemplo, com a forma como abordamos o doente em morte cerebral, por forma a reduzir os efeitos fisiopatológicos decorrentes deste estado. A administração de catecolaminas pareceu melhorar a função do enxerto, tendo a administração de dopamina sido associada a uma diminuição da função tardia do enxerto e a um aumento da sobrevivência (13,61), enquanto a administração de norepinefrina é considerada no estudo de Giral M. (62) como um factor de risco para uma mais prolongada função tardia do enxerto.

Uma outra abordagem, também ela numa fase precoce e ainda antes de explantar o rim do corpo do dador, é o pré-condicionamento isquémico do órgão. Esta técnica consiste em induzir no órgão uma tolerância à isquémia, através da criação de períodos curtos e cíclicos de isquémia e reperusão mediante a clampagem intermitente do pedículo vascular do órgão(3,10,63). A abordagem classicamente descrita é cirúrgica, porém o desenvolvimento de uma estratégia não invasiva (mediante a indução de curtos ciclos de isquémia com recurso a braçadeiras como as utilizadas para a medição da pressão arterial nos membros) tem vindo a ser assunto de discussão. Embora o pré-condicionamento isquémico ainda não seja aplicado na prática clínica, em teoria tanto uma abordagem como outra, são intervenções simples com potencial para serem aplicadas em diferentes órgãos (63). Outra opção, ainda que dentro deste grupo é a perfusão normotérmica regional (PNR), anteriormente descrita.

A forma mais fácil e direta de manipular o órgão é durante o período de preservação, uma vez que este abre uma janela para a possibilidade de administração de diferentes agentes com capacidade de reduzir eventuais danos e restabelecer a funcionalidade do órgão. Estes agentes

tanto podem ser incluídos na solução de preservação como injetados diretamente nos vasos canulados. Uma vantagem deste tipo de estratégia é a possibilidade de utilizar estas substâncias em doses superiores às aquelas que são usadas *in vivo*, não esquecendo que todas devem ser dadas na forma de substâncias ativas. Este grupo de agentes inclui desde antibióticos, antivíricos, antifúngicos, anti-inflamatórios, vasodilatadores para aumentar a perfusão sobretudo a nível da microvasculatura, agentes fibrinolíticos como via de dissolução de pequenos microtrombos, até agentes osmóticos para reduzir o eventual edema intersticial (35).

Moléculas solúveis libertadoras de monóxido de carbono, dadores de óxido nítrico podem aumentar o fluxo sanguíneo renal através da indução do relaxamento do músculo liso vascular (via ativação de guanil-ciclases solúveis importantes na produção de cGMP), sendo reconhecidas como importantes alvos no tratamento de lesões de isquémia-reperusão, influenciando as taxas de rejeição e a sobrevivência do enxerto renal (16,43,44).

O uso de ciclosporina ou tacrolimus durante o período de preservação relaciona-se com uma maior sobrevivência do enxerto e com a redução das características acima descritas como associadas a lesão crónica do enxerto. Contudo, não é claro se esse efeito se deve ao seu potencial como imunossuppressores ou à redução da taxa de filtração glomerular (TFG) associada aos inibidores da calcineurina, este último pode mimetizar o efeito obtido com a administração de IECAs (13). Uma redução na TFG, como aquela que é obtida com o uso de IECAs, reduz a velocidade de destruição do enxerto (13).

Outros exemplos são o factor de crescimento dos fibroblastos (FGF) e análogo do heme (cobalto protoporfirina –CoPP, com capacidade para regular positivamente o gene da hemoxigenase-1). Ambos proporcionam, em modelos ainda experimentais, uma recuperação ativa em rins submetidos a isquémia quente (43,44). O último, por meio da redução da lesão induzida por radicais livres (efeito antioxidante) e por efeitos anti-inflamatórios.

Uma outra abordagem é a administração endovenosa de siRNAs (RNAs de interferência) ou vetores virais (35) dirigidos ao p53, conhecido como sendo um importante indutor de apoptose das células tubulares renais, porém os estudos com siRNAs são ainda experimentais (10).

No plano da atuação ao nível do receptor, merece destaque o chamado pós-condicionamento. Na maioria dos casos trata-se de um pós-condicionamento isquêmico, conseguido através da utilização de um conjunto de moléculas como adenosina, opióides, bradicinina, eritropoietina, óxido nítrico endógeno, acetilcolina, TNF e IL-6 e diminuição da expressão de factores teciduais (3,10,16). Estas mesmas moléculas podem também ser usadas em pré-condicionamento (*remote ischemic preconditioning*), podendo em ambos os casos ser administradas farmacologicamente ou como moléculas intermediárias que atuem em vias de sinalização que culminam na expressão das anteriores.

5.8.1 Terapêutica celular e Terapêutica Génica

A máquina de perfusão, para além das eventuais vantagens acima discutidas, pode oferecer uma ferramenta para reparação e aumento da qualidade dos órgãos antes da transplantação, podendo mesmo imunomodulá-los a ponto de os proteger da resposta imunoadaptativa do recetor (35).

Terapêutica com *stem cells* e terapêutica génica são áreas que, embora ainda em investigação, podem ser aplicadas durante a preservação normotérmica *ex-vivo*, sendo dirigidas sobretudo a problemas como rejeição e fibrose (54).

A neonefrogenese é definida como a capacidade do tecido renal em regenerar, embora seja ainda pouco evidente em humanos, representa uma abordagem promissora para enxertos renais (10). As células tronco mesenquimatosas (MSC) com a sua capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, com propriedades imunomoduladoras e com

capacidade de secretar mediadores solúveis, assumem um papel de particular importância na transplantação de órgãos sólidos (10,11,35,43). Estas são fonte de secreção de fatores de crescimento, citocinas com efeito mitogénico, anti-apoptótico e anti-inflamatório (43). Este tipo de células possui também a capacidade de se fixar (*homing*) no tecido danificado. Deste modo, a administração sistémica das mesmas pode ser difícil. Esta limitação é, contudo, ultrapassada pela sua administração durante a perfusão do órgão *ex-vivo* (43). A máquina de perfusão é a única plataforma para administrar seletivamente MSCs diretamente no órgão, superando assim questões como *homing e trafficking* (35). Além das *stem cells* mesenquimatosas, podem também ser usadas células do estroma vascular dos adipócitos, com interesse na evicção de um segundo enxerto, bem como *stem cells* da linhagem amniótica (10).

As experiências com células tronco em transplantação têm emergido como tentativa de atenuar a severidade das lesões por isquémia-reperfusão e facilitar a recuperação das mesmas, bem como reduzir a rejeição aguda e crónica (35).

Quanto à terapia génica, a sua capacidade de inserção de genes como forma a bloquear ou estimular vias celulares associadas a rejeição aguda ou crónica torna-a uma terapia bastante atrativa em transplantação (16,43). Esta pode ser realizada com recurso a vetores (virais ou não virais), embora a sua capacidade de estimular o sistema imune e toxicidade seja significativa, sobretudo com os primeiros e, por isso, com reconhecidas limitações. Tal como sucede com a terapia com MSCs e do mesmo modo, também aqui a perfusão normotérmica *ex-vivo* contorna esse problema.

No que diz respeito à terapia génica, o papel da alteração das vias de sinalização celular na proteção de órgãos durante a hipotermia e durante a reperfusão continua por explicar. É uma área complexa e envolve uma variedade de vias de sinalização em interação. Curioso é o facto de que, embora a hipotermia seja permissiva no que toca à ativação do factor iniciador

de uma das principais cascatas celulares, a via das MAPcinases, os passos subsequentes/efetores estão suprimidos durante a hipotermia até ao reaquecimento do órgão (3).

A modulação deste tipo de sinalização através de administração de factores de crescimento receptor-mediados ocorre numa escala temporal compatível com a logística e *timing* inerente à colheita e preservação de órgãos.

A administração de ligandos de proteína, como factores tróficos que afetam as cascatas de sinalização (IGF-1, NGF- β e substância P) tem demonstrado aumentar a *performance* do enxerto pós-transplante e diminuído as lesões de longo prazo, como a hipertrofia da íntima(3). A combinação destes factores com antibióticos resulta numa quase duplicação da duração de uma preservação estática segura e redução das demais lesões isquémicas em intervalos curtos de preservação (3).

6. Discussão e Conclusão

Não existe, até à data, uma técnica de preservação ideal e universalmente recomendada. Embora a preservação estática em frio seja, ainda hoje, o padrão das técnicas de preservação, esta tem vindo a ser apontada por apresentar algumas limitações, sobretudo no que diz respeito à preservação de órgãos subóticos (órgãos de dadores com critérios alargados e dadores em morte cardiocirculatória). Estes são caracteristicamente dotados de uma maior sensibilidade à isquémia, o que justifica, em parte, alguma da relutância face ao seu uso.

O aumento da utilização deste tipo de órgãos, motivado pela discrepância crescente entre o número de dadores e o número de doentes em lista de espera, incentivou o revisitar das técnicas dinâmicas, em particular da máquina de perfusão hipotérmica, originalmente um ancestral da preservação estática. Dos vários resultados obtidos com os inúmeros estudos, a máquina de perfusão hipotérmica parece apresentar melhores resultados, com uma redução da função tardia do enxerto superior à registada com a preservação estática em frio. Este efeito parece ser particularmente marcante quando a técnica é aplicada à preservação de órgãos que registaram função tardia do enxerto, órgãos subóticos *per si*. Apesar dos vários estudos, os resultados ainda não são consensuais. Quando a respeito da sobrevivência do paciente e sobrevivência do enxerto, embora a máquina de preservação hipotérmica apresente resultados superiores, estes não são estatisticamente significativos. Apesar dos poucos estudos de natureza económica, esta técnica tem-se mostrado custo-efetiva, particularmente a respeito de órgãos de dadores com critérios alargados. O revisitar das técnicas dinâmicas pode ser a chave para otimizar este tipo de órgãos e assim aumentar o número de órgãos que é possível transplantar.

Dentro das técnicas dinâmicas, a perfusão normotérmica tem merecido também um maior destaque nos últimos tempos. A sustentação do metabolismo celular com recurso à

normotermia parece estar na base dos resultados favoráveis obtidos com esta técnica. À semelhança do que acontece com a máquina de preservação hipotérmica, registou-se uma diminuição da função tardia do enxerto com uso da perfusão normotérmica quando em comparação com a preservação estática em frio, embora a sobrevivência do enxerto e do paciente também não seja afetada de forma estatisticamente significativa. A normotermia pode também ser aplicada nas suas variantes perfusão normotérmica regional e recondicionamento normotérmico. A primeira parece ser importante para aumentar o número de potenciais dadores, a segunda assume-se determinante na restauração da função renal e restabelecimento dos níveis de ATP pré-implante.

Ambas as técnicas de perfusão, normotérmica ou hipotérmica podem fazer uso de oxigenação, embora não haja evidências concretas de que os resultados sejam superiores com a sua utilização. Anteriormente a oxigenação era tida como fundamental porém, com as atuais soluções de preservação a sua utilização deixou de ser fundamental preconizando-se agora uma utilização seletiva. Esta seletividade assenta sobretudo na possibilidade de geração de radicais livres de oxigénio que podem ser tóxicos para o órgão.

Face ao paradigma vigente, a avaliação da viabilidade pré-transplante tem vindo a tornar-se cada vez mais importante. Neste aspecto as técnicas dinâmicas oferecem uma oportunidade única para auxiliar a decisão de aceitar ou não aceitar determinado órgão para transplante. Não existe um método/parâmetro que permita inferir com segurança a qualidade e a viabilidade do órgão. Os parâmetros mecânicos fornecidos pela máquina, a par dos biomarcadores encontrados no perfusato mostram relação com a ocorrência de função tardia do enxerto, sendo por isso os mais explorados. A ecografia contrastada, a ecotridimensional e a ressonância magnética espectral são também formas de avaliar a viabilidade do órgão mas encontram-se ainda em estudo. Em geral, a perfusão normotérmica oferece uma avaliação mais acurada da viabilidade do que as demais técnicas.

A manipulação do enxerto pré-transplante é também um ponto importante, com a necessidade de recorrer a órgãos de doadores marginais, a possibilidade de manipulação durante o período de preservação, sobretudo mediante a administração de inúmeros agentes, assume um papel de relevo. A terapêutica celular e a terapêutica génica têm também um papel de destaque embora ainda em fases muito iniciais, apresentam-se como um desafio no futuro.

Muito há para investigar no que diz respeito à forma como preservamos enxertos para transplante. A hipotermia e a isquémia parecem ser os principais factores limitantes a respeito da preservação de órgãos. Implementar uma nova estratégia no atual plano de preservação de órgãos não é tarefa fácil e muitas vezes implica pessoal especializado, uma logística capaz e investimento financeiro. Ainda assim, a máquina de perfusão parece ser uma promissora aposta face à presente necessidade em expandir o *pool* de potenciais doadores e assim aumentar não só o número de transplantes efetuados como também melhorar os resultados obtidos.

7. Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Alfredo Mota pela oportunidade e privilégio de elaborar este trabalho na área científica de Urologia.

Ao meu orientador e ao meu co-orientador, mestre Pedro Nunes e mestre Pedro Moreira, pela disponibilidade, prontidão e colaboração neste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós, por todo o apoio, por acreditarem em mim e por me fazerem querer sempre ser mais e melhor; e à minha tia Fátima pelo exemplo que é para mim e por toda a força que me transmite.

Aos meus amigos por me acompanharem, incentivarem e encorajarem e por estarem sempre ao meu lado.

8. Referências Bibliográficas

1. Catena F, Coccolini F, Montori G, Vallicelli C, Amaduzzi a, Ercolani G, et al. Kidney preservation: review of present and future perspective. *Transplant Proc.* Elsevier Inc; 2013 Nov; 45(9):3170–7.
2. Plata-Munoz JJ, Muthusamy A, Quiroga I, Contractor HH, Sinha S, Vaidya A, et al. Impact of pulsatile perfusion on postoperative outcome of kidneys from controlled donors after cardiac death. *Transpl Int.* 2008 Sep; 21(9):899–907
3. McAnulty JF. Hypothermic organ preservation by static storage methods: Current status and a view to the future. *Cryobiology.* Elsevier Inc.; 2010 Jul; 60(3 Suppl):S13–9.
4. Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration, Healthcare Systems Bureau, Division of Transplantation, Rockville, MD; United Network for Organ Sharing, Richmond, VA; University Renal Research and Education Association, Ann Arbor, MI; Annual Report 2012 of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients: Transplant Data.
5. Macário F. Transplantação em Portugal - Estatísticas. SPT-Sociedade Portuguesa de Transplantação. 2010.
6. Groen H, Moers C, Smits JM, Treckmann J, Monbaliu D, Rahmel a, et al. Cost-effectiveness of hypothermic machine preservation versus static cold storage in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2012 Jul ; 12(7):1824–30.
7. Watson CJE, Wells a C, Roberts RJ, Akoh J a, Friend PJ, Akyol M, et al. Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. *Am J Transplant.* 2010 Sep;10(9):1991–9.
8. O’Callaghan J, Leuvenink HGD, Friend PJ, Ploeg RJ. *Kidney Preservation - Principles and Practice* 7th edition. Elsevier Inc.; 2013. p. 130–41.
9. Van der Vliet JA, Warlé MC. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013 Apr; 18(2):174–8.
10. Bon D, Chatauret N, Giraud S, Thuillier R, Favreau F, Hauet T. New strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation. *Nat Rev Nephrol.* Nature Publishing Group; 2012 Jun; 8(6):339–47.
11. Salahudeen A. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol.* 2004; 287(2):181–7.
12. Taylor MJ, Baicu SC. Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: The clinical perspective. *Cryobiology.* Elsevier Inc.; 2010 Jul; 60(3 Suppl):S20–35.

13. Renders L, Heemann U. Chronic renal allograft damage after transplantation: what are the reasons, what can we do? *Curr Opin Organ Transplant*. 2012 Dec; 17(6):634–9.
14. Opelz G, Döhler B. Multicenter analysis of kidney preservation. *Transplantation*. 2007 Feb 15; 83(3):247–53.
15. Giblin L, O’Kelly P, Little D, Hickey D, Donohue J, Walshe JJ, et al. A comparison of long-term graft survival rates between the first and second donor kidney transplanted--the effect of a longer cold ischaemic time for the second kidney. *Am J Transplant*. 2005 May; 5(5):1071–5.
16. Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez J V, Fuller BJ. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus Med Hemother*. 2011 Jan; 38(2):125–42.
17. Cho YW, Bunnapradist S, Cho ES, Stadtler M, Simmons V, Locke J, et al. Can machine perfusion decrease the likelihood of discard among biopsied kidneys? *Transplant Proc*. 2008 May; 40(4):1029–31.
18. Port F, Bragg-Gresham J. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors¹. *Transplantation*. 2002;74:1281–6.
19. Watson CJE, Johnson RJ, Birch R, Collett D, Bradley JA. A simplified donor risk index for predicting outcome after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2012 Feb; 93(3):314–8.
20. Evaluation HT. Machine perfusion systems and cold static storage of kidneys from deceased donors. NICE technology appraisal guidance 165. 2009.
21. Summers DM, Johnson RJ, Hudson A, Collett D, Watson CJ, Bradley JA. Effect of donor age and cold storage time on outcome in recipients of kidneys donated after circulatory death in the UK: a cohort study. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2013 Mar; 381(9868):727–34.
22. Cronin A, Douglas J. Balancing effectiveness and equality of opportunity in organ allocation. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2013 May; 381(9880):1816.
23. Yuan X, Theruvath AJ, Ge X, Floerchinger B, Jurisch A, García-Cardena G, et al. Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. *Transpl Int*. 2010 Jun; 23(6):561–70.
24. Belzer FO, Ashby BS, Gulyassy PF, Powell M. Successful seventeen-hour preservation and transplantation of human-cadaver kidney. *N Engl J Med*. 1968 Mar; 278(11):608–10.
25. Jiao B, Liu S, Liu H, Cheng D, Cheng Y, Liu Y. Hypothermic machine perfusion reduces delayed graft function and improves one-year graft survival of kidneys from expanded criteria donors: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Jan; 8(12):e81826.

26. Bathini V, McGregor T, McAlister VC, Luke PPW, Sener A. Renal perfusion pump vs cold storage for donation after cardiac death kidneys: a systematic review. *J Urol*. Elsevier Inc.; 2013 Jun; 189(6):2214–20.
27. R. Y. Calne, D. E. Pegg, J. Pryse-Davies and FLB. Renal Preservation by Ice-cooling. *Br Med J*. 1963; 2(5358):640–4, 651–5.
28. Maathuis M-HJ, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007 May 27; 83(10):1289–98.
29. Timsit M-O, Tullius SG. Hypothermic kidney preservation: a remembrance of the past in the future? *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Apr; 16(2):162–8.
30. Charles Y. Lee and MJM. Preservation methods for kidney and liver. *Organogenesis*. 2009; 5(3):105–12.
31. Pirenne J. Time to think out of the (ice) box. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Apr;15(2):147–9.
32. Gallinat A, Moers C, Treckmann J, Smits JM, Leuvenink HGD, Lefering R, et al. Machine perfusion versus cold storage for the preservation of kidneys from donors \geq 65 years allocated in the Eurotransplant Senior Programme. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Dec; 27(12):4458–63.
33. O’Callaghan JM, Morgan RD, Knight SR, Morris PJ. Systematic review and meta-analysis of hypothermic machine perfusion versus static cold storage of kidney allografts on transplant outcomes. *Br J Surg*. 2013 Jul;100(8):991–1001.
34. Fuller BJ, Lee CY. Hypothermic perfusion preservation: the future of organ preservation revisited? *Cryobiology*. 2007 Apr; 54(2):129–45.
35. Van Raemdonck D, Neyrinck A, Rega F, Devos T, Pirenne J. Machine perfusion in organ transplantation: a tool for ex-vivo graft conditioning with mesenchymal stem cells? *Curr Opin Organ Transplant*. 2013 Feb;18(1):24–33.
36. Taylor MJ, Baicu C. Organs : The Clinical Perspective. 2011;60:1–38.
37. Moustafellos P, Hadjianastassiou V, Roy D, Mukhtadir a, Contractor H, Vaidya a, et al. The influence of pulsatile preservation in kidney transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 2007 Jun;39(5):1323–5.
38. Cyril Moers, M.D., Jacqueline M. Smits, M.D., Ph.D., Mark-Hugo J. Maathuis, M.D., Ph.D., Jürgen Treckmann, M.D., Frank van Gelder, Bogdan P. Napieralski, Margitta van Kasterop-Kutz, Jaap J. Homan van der Heide, M.D., Ph.D., Jean-Paul Squifflet, M.D., Ph. PD, Axel Rahmel, M.D., Ph.D., Henri G.D. Leuvenink, Ph.D., Andreas Paul, M.D., Ph.D., Jacques Pirenne, M.D., Ph.D., and Rutger J. Ploeg, M.D. PD. Machine Perfusion or Cold Storage in Deceased-Donor Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360:7–19.

39. Treckmann J, Moers C, Smits JM, Gallinat A, Maathuis M-HJ, van Kasterop-Kutz M, et al. Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death. *Transpl Int*. 2011 Jun;24(6):548–54.
40. Kwiatkowski A, Wszola M. The early and long term function and survival of kidney allografts stored before transplantation by hypothermic pulsatile perfusion. A prospective randomized study. *Ann Transpl* . 2009;14(1):14–7.
41. Jochmans I, Moers C, Smits JM, Leuvenink HGD, Treckmann J, Paul A, et al. Machine perfusion versus cold storage for the preservation of kidneys donated after cardiac death: a multicenter, randomized, controlled trial. *Ann Surg*. 2010 Nov; 252(5):756–64.
42. Moers C, Smits J. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2012; 366(8):770–1.
43. Hosgood S a, van Heurn E, Nicholson ML. Normothermic machine perfusion of the kidney: better conditioning and repair? *Transpl Int*. 2014 Mar; 1–8.
44. Hosgood S a, Nicholson ML. Normothermic kidney preservation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Apr;16(2):169–73.
45. Morrissey PE, Monaco AP. Donation after circulatory death: current practices, ongoing challenges, and potential improvements. *Transplantation*. 2014 Feb; 97(3):258–64.
46. Valero R, Cabrer C. Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors. *Transpl Int*. 2000;13:303–10.
47. Jf M, Jc M, Sa R, Mt G, Rh C, Rm M, et al. Extracorporeal support for organ donation after cardiac death effectively expands the donor pool . Publication Types , MeSH Terms PubMed Commons. *J Trauma*. 2005;58(6):1095–101.
48. Hosgood S a, Barlow AD, Yates PJ, Snoeijs MGJ, van Heurn ELW, Nicholson ML. A pilot study assessing the feasibility of a short period of normothermic preservation in an experimental model of non heart beating donor kidneys. *J Surg Res*. Elsevier Ltd; 2011 Nov;171(1):283–90.
49. Jamieson RW, Friend PJ. Normothermic organ preservation. *Transplant Rev*. 2006 Oct;20(4):172–8.
50. Humphreys MR, Ereth MH, Sebo TJ, Slezak JM, Dong Y, Blute ML, et al. Can the kidney function as a lung? Systemic oxygenation and renal preservation during retrograde perfusion of the ischaemic kidney in rabbits. *BJU Int*. 2006 Sep; 98(3):674–9.
51. Hosgood S a, Nicholson HFL, Nicholson ML. Oxygenated kidney preservation techniques. *Transplantation*. 2012 Mar 15; 93(5):455–9.

52. Hosgood S a, Nicholson ML. The role of perfluorocarbon in organ preservation. *Transplantation*. 2010 May; 89(10):1169–75.
53. Bagul a, Hosgood S a, Kaushik M, Kay MD, Waller HL, Nicholson ML. Experimental renal preservation by normothermic resuscitation perfusion with autologous blood. *Br J Surg*. 2008 Jan;95(1):111–8.
54. Nicholson ML, Hosgood S a. Renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion: the first clinical study. *Am J Transplant*. 2013 May; 13(5):1246–52.
55. Jochmans I, Pirenne J. Graft quality assessment in kidney transplantation: not an exact science yet! *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Apr;16(2):174–9.
56. Nyberg SL1, Baskin-Bey ES, Kremers W, Prieto M, Henry ML SM. Improving the prediction of donor kidney quality: deceased donor sc. *Transplantation*. 2005;80(7):925–9.
57. Sung RS, Christensen LL, Leichtman a B, Greenstein SM, Distant D a, Wynn JJ, et al. Determinants of discard of expanded criteria donor kidneys: impact of biopsy and machine perfusion. *Am J Transplant*. 2008 Apr; 8(4):783–92.
58. Patel SK, Pankewycz OG, Nader ND, Zachariah M, Kohli R, Laftavi MR. Prognostic utility of hypothermic machine perfusion in deceased donor renal transplantation. *Transplant Proc*. Elsevier Inc.; 2012 Sep; 44(7):2207–12.
59. Van Smaalen TC, Hoogland ERP, van Heurn LWE. Machine perfusion viability testing. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013 Apr; 18(2):168–73.
60. Moers C, Oc V, E VH, Jochmans I, Gr K, Rahmel A, et al. The value of machine perfusion perfusate biomarkers for predicting kidney transplant outcome . *PubMed Commons*. *Transplantation*. 2010;90:966–73.
61. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc*. 2008 Dec; 40(10):3279–88.
62. Giral M, Jp B, Foucher Y, Villers D, Bironneau E, Blanloeil Y, et al. Effect of brain-dead donor resuscitation on delayed graft function : results of a monocentric analysis . *Transplantation*. 2007 May; 83(9):1–2.
63. Van den Akker EK, Manintveld OC, Hesselink D a, de Bruin RWF, Ijzermans JNM, Dor FJMF. Protection against renal ischemia-reperfusion injury by ischemic postconditioning. *Transplantation*. 2013 Jun; 95(11):1299–305.